Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait ⁽¹⁾

G. MIRANDA et J.C. GRIPON

*I.N.R.A./C.N.R.Z., Laboratoire de Biochimie et de Technologie
laitières - 78350 Jouy-en-Josas, France*

Résumé

Les laits de vache renferment différents enzymes protéolytiques susceptibles de provoquer des modifications des constituants du lait. Certains sont présents naturellement dans le lait, d'autres sont sécrétés par des micro-organismes, d'autres, enfin, sont libérés, en cas d'infection de la mamelle, lors de la destruction de cellules et de structures cellulaires par des bactéries pathogènes. Dans cette revue nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la plasmine et à certaines protéases de bactéries psychrotrophes, en examinant les données concernant leur teneur ou leur production, leur activité protéolytique et les facteurs de variation de cette activité. Nous avons également évoqué les incidences technologiques dues à leur présence dans le lait et les produits laitiers.

Mots clés : Protéolyse - Plasmine - Protéases - Psychrotrophes - Lait.

Introduction

Les enzymes protéolytiques jouent un rôle important dans l'industrie laitière où ils interviennent dans différents processus technologiques. Toutefois certains enzymes peuvent provoquer une protéolyse incontrôlée des constituants du lait lors de son stockage à basse température et entraîner l'apparition de défauts dans certains produits laitiers ou bien des pertes de rendement au cours de la fabrication des fromages. Ces protéases peuvent provenir de diffé-

(1) Adapté d'une conférence prononcée lors des journées organisées conjointement par l'I.N.R.A., l'E.N.S.A.R. et l'I.N.A.-P.G. sur « La composition chimique du lait et ses incidences technologiques », Rennes, 26-28 sept. 1984.

rentes sources. Certaines sont présentes dans le lait dès la sécrétion. Parmi ces protéases, la plasmine est le composant majoritaire. De nombreux travaux ont montré que cette dernière provient du sang et migre dans le lait via la glande mammaire (KAMINOGAWA *et al.*, 1972; TOMICH *et al.*, 1976; EIGEL *et al.*, 1979; REIMERDES *et al.*, 1981; REIMERDES, 1981). Certains micro-organismes présents dans le lait cru et pouvant se développer à basse température (bactéries psychrotrophes) sont également susceptibles de sécréter des enzymes protéolytiques. Parmi eux, le genre *Pseudomonas* et tout particulièrement l'espèce *fluorescens*, synthétise des protéases exocellulaires thermostables (LAW, 1979). Une dernière source d'enzymes protéolytiques dans le lait peut être due à la présence de cellules somatiques (en particulier des leucocytes) et à la destruction de cellules et de structures cellulaires survenant à la suite de l'invasion et de la croissance de bactéries pathogènes dans la mamelle. Dans les laits de mammites le nombre de cellules somatiques peut être considérablement accru (d'un facteur 2 à 50) (KITCHEN, 1981) et le niveau de protéolyse plus élevé que dans les laits normaux (ANDREWS, 1983). Un certain nombre de documents ou de revues de synthèse sur les enzymes protéolytiques présents dans le lait, ont été publiées (HUMBERT et ALAIS, 1979; LAW, 1979; Fox, 1981; VISSER, 1981; COUSIN, 1982; SUHREN, 1983). Dans cette revue, nous avons détaillé plus particulièrement les propriétés biochimiques de la plasmine et des protéases de bactéries psychrotrophes et développé également les incidences technologiques de leur présence dans le lait et les produits laitiers.

I. Protéases natives du lait

Le système protéasique endogène du lait a été abondamment étudié ces dernières années. On a pu ainsi montrer qu'il était constitué de plusieurs activités protéolytiques différentes. Parmi celles-ci « la protéase alcaline du lait » ou plasmine exerce une activité prédominante. En plus de la plasmine, REIMERDES *et al.* (1981) indiquent la présence d'une autre protéase alcaline qui serait analogue à la thrombine. L'existence d'une protéase acide dans le lait, de type cathepsine D, a été mise en évidence par KAMINOGAWA et YAMAUCHI en 1972. D'autres travaux font part de l'existence d'activités aminopeptidasiques (REIMERDES *et al.*, 1979). L'action de ces enzymes dans le lait est très mal connue, elle reste toutefois plus faible que celle de la plasmine, aussi, par la suite, nous nous intéresserons uniquement à cette dernière.

A. Teneur en plasmine et en plasminogène

Les teneurs en plasmine et en plasminogène peuvent varier de manière importante entre laits individuels. Chez la vache, la concen-

tration en plasmine se situerait entre 0,15 et 0,37 mg/l (RICHARDSON, 1983). Selon KORYCKA DAHL *et al.* (1983) elle serait en moyenne de l'ordre de 0,1 mg/l. La concentration en plasminogène est plus élevée que celle de la plasmine : 0,55 à 2,75 mg/l (RICHARDSON et PEARCE, 1981) ; 0,7 à 2,4 mg/l (ROLLEMA *et al.*, 1983). Selon RICHARDSON (1983) il y aurait en moyenne 9 fois plus de plasminogène que de plasmine dans les laits de vache. ROLLEMA *et al.* (1983) ont observé pour leur part des teneurs en plasminogène 4,8 à 37 fois plus élevées que les teneurs en plasmine.

En dehors des variations individuelles, un certain nombre de facteurs peuvent avoir une influence sur la concentration en plasmine dans les laits de vache. En fin de lactation RICHARDSON (1983) observe une teneur en plasmine 3 fois plus importante qu'en début de lactation. L'augmentation de la teneur en plasmine au cours de la lactation serait due à une « perméabilité » accrue de la glande mammaire vis-à-vis des protéines du sang et non à une activation plus forte du plasminogène. La race de la vache peut être également un facteur de variation de la teneur en plasmine (RICHARDSON, 1983). En cas de mammites les teneurs en plasmine et en plasminogène peuvent être considérablement accrues (BARRY et DONNELLY, 1981 ; DE RHAM et ANDREWS, 1982). En effet, il a été montré que les altérations de la mamelle, en plus de la diminution des activités synthétiques et sécrétrices des cellules épithéliales, entraînent une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins se traduisant par une augmentation du passage des protéines du sang dans le lait (KITCHEN, 1981).

B. Propriétés de la plasmine (tabl. 1)

1. Spécificité

La plasmine appartient au groupe des protéases à sérine, elle est en effet inactivée par les inhibiteurs spécifiques de ces enzymes tels que le D.F.P. (di-isopropylfluorophosphate). Elle coupe spécifiquement les liaisons peptidiques de type Lys-X. Certaines liaisons de type Arg-X sont également hydrolysées mais beaucoup plus lentement (WEINSTEIN et DOOLITTLE, 1972).

L'activité protéolytique de la plasmine s'exerce préférentiellement sur les caséines β et α_{s2} , qui sont hydrolysées sensiblement à la même vitesse (SNOEREN et VAN RIEL, 1979). Les produits de la dégradation de la caséine α_{s2} n'ont pas été identifiés. Certains d'entre eux ont une migration électrophorétique, à pH 9, plus rapide que celle de la caséine α_{s2} alors que d'autres ont une migration cathodique (SNOEREN et VAN RIEL, 1979). L'action de la plasmine sur la caséine β provoque l'apparition de 3 produits de dégradation correspondant aux caséines γ_1 (fragment 29-209), γ_2 (fragment 106-209) et γ_3 (fragment 108-209) (EIGEL, 1977 a). Les caséines γ représentent en moyenne dans le lait, 2 à 3 % des caséines totales (ANDREWS et

TABLEAU 1
Propriétés caractéristiques de la plasmine
Characteristic properties of Plasmin

Activité Optimale		Résistance au chauffage			REFERENCES
pH	température (°C)	température (°C)	temps (min)	activité résiduelle (%)	
6,5-9(a)	37(a)	60	30	90	DULLEY (1972)
8,0(b)	37(b)	80	10	0	KAMINOGAWA <i>et al.</i> (1972)
7,5-8,0(c)	-	-	-	-	REIMERDES <i>et al.</i> (1975)
-	-	80	10	0	TOMICH <i>et al.</i> (1976)
-	-	72,5	35,7	10	DRIESSEN et VAN DER WAALS (1978)
-	-	85,0	6,4	10	" " "
-	-	120,0	0,25	10	" " "
-	-	142,0	0,12	10	" " "

a= tampon sodium tetraborate 0,05 M; b= tampon Tris HCl 0,05 M; c= tampon Tris borate 0,02 M

ALICHANIDIS, 1983). Les compléments N terminaux des caséines γ constituent une fraction importante des protéoses peptones. Le composant PP5 est constitué du mélange des compléments des caséines γ_2 et γ_3 (ANDREWS, 1978 a), le composant PP8F correspondant au complément de la caséine γ_1 (ANDREWS, 1978 b).

La caséine α_{S1} est hydrolysée plus lentement que les caséines β et α_{S2} (NOOMEN, 1975). L'action de la plasmine sur cette caséine provoque l'apparition de produits de dégradation, non identifiés, de poids moléculaire apparents 20500, 12300 et 10300 (EIGEL, 1977 b), ainsi que de 2 peptides de poids moléculaire 5500 et 6000, de même migration électrophorétique, correspondant à la caséine λ , fraction mineure de la caséine entière (AIMUTIS et EIGEL, 1982).

La plasmine n'attaque pas ou très peu la caséine χ (EIGEL, 1977 b). Elle n'hydrolyse pas non plus l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline (YAMAUCHI et KAMINOGAWA, 1972), cette dernière se comporterait même comme un inhibiteur (KAMINOGAWA *et al.*, 1972).

2. Température et pH optimum

La plupart des auteurs situent la température optimale pour l'activité de la plasmine à 37° C (KAMINOGAWA *et al.*, 1969 ; DULLEY, 1972 ; REIMERDES *et al.*, 1975 ; RICHTER *et al.*, 1977). Selon DONNELLY et BARRY (1983) la plasmine est 20 fois plus active à 37° C qu'à 4° C. Toutefois, REIMERDES et HERLITZ (1979) ont observé dans des laits conservés 48 h à 4° C une teneur en caséines γ plus élevée (25 %) que dans des laits conservés pendant la même période à 26° C indiquant une augmentation de l'activité de la plasmine. Selon ces

auteurs, à basse température, la caséine β et la plasmine se dissocieraient des micelles de caséine entraînant ainsi une plus forte concentration de substrat et d'enzyme dans le sérum.

La plasmine possède un maximum d'activité à pH légèrement alcalin. De nombreux auteurs s'accordent pour situer le pH optimum aux environs de 8,0 (KAMINOGAWA *et al.*, 1972 ; SHAHANI *et al.*, 1973 ; REIMERDES *et al.*, 1975). DULLEY (1972), pour sa part, décrit une zone d'activité maximum entre pH 6,5 et pH 9,0. A des pH inférieurs à 5,0 ou supérieurs à 9,0 la plasmine perd sa stabilité (KAMINOGAWA *et al.*, 1972).

C. Effet du chauffage sur l'activité protéolytique : thermostabilité

La perte d'activité de la plasmine purifiée commence à être notable à des températures supérieures à 50° C (KAMINOGAWA *et al.*, 1972). Par chauffage à 80° C pendant 10 min la plasmine est totalement inactivée (KAMINOGAWA *et al.*, 1972 ; SHAHANI *et al.*, 1973 ; TOMICH *et al.*, 1976). Selon DULLEY (1972) la thermostabilité de l'enzyme serait dépendante du pH. A pH acide elle serait moins stable qu'à un pH voisin de la neutralité. Dans le lait stérilisé par autoclavage à 120° C pendant 15 min la plasmine est totalement inactivée (DRIESSEN et VAN DER WAALS, 1978 ; SNOEREN *et al.*, 1980). Cependant elle résiste partiellement à certains traitements de stérilisation U.H.T. (142° C, 3 secondes) (DRIESSEN et VAN DER WAALS, 1978 ; SNOEREN *et al.*, 1980). Un temps de chauffage de 16 secondes à 142° C semble être nécessaire pour l'inactiver totalement (DRIESSEN, 1983). La pasteurisation ne semble pas détruire l'activité de la plasmine ou du moins très légèrement. RICHARDSON (1983) observe une faible diminution de l'activité de la plasmine dans le lait (environ 17 %) après pasteurisation à 75° C pendant 15 secondes ; résultat qui semble en accord avec ceux observés par KORYCKA-DAHL *et al.* (1983). Certains auteurs ont montré que la pasteurisation du lait (75° C, 15 secondes) entraîne une augmentation de l'activité de la plasmine lors du stockage du lait à 37° C. Selon NOOMEN (1975) cette augmentation d'activité serait de l'ordre de 30 à 40 % après un stockage de 3 jours. Dans les mêmes conditions, RICHARDSON (1983) observe pour sa part une augmentation de l'ordre de 400 % de l'activité de la plasmine. Il est à signaler toutefois que cet auteur utilisait dans son expérimentation des laits de fin de lactation. Un certain nombre d'hypothèses ont été avancées pour expliquer cette augmentation d'activité. NOOMEN en 1975, suggérerait une possible inactivation de l'inhibiteur trypsique présent dans le lait, par la pasteurisation. Cependant selon RICHARDSON (1983) cet inhibiteur trypsique présente une stabilité au chauffage similaire à celle de la plasmine et du plasminogène. Cet auteur suggère comme hypothèse l'existence probable, dans le lait, d'un inhibiteur thermosensible de l'activateur du plasminogène, qui serait détruit par la pasteurisation. La présence d'un tel inhibiteur

a été montrée dans le sang à faible concentration (GALLIMORE, 1979) et, récemment, dans le lait par KORYCKA DAHL *et al.* (1983).

D. Incidences technologiques

Du fait de sa thermostabilité, la plasmine peut jouer un rôle lors de la conservation des produits laitiers ayant subi un traitement thermique, en limitant leur durée de vie. Parmi les phénomènes pouvant se produire, la gélification au cours du stockage des laits stérilisés par traitement UHT (de l'ordre de 142° C - 3 secondes) est un sérieux problème pour l'industrie laitière. Selon certains auteurs la gélification serait une conséquence directe de la protéolyse (PAYENS, 1978 ; SNOEREN *et al.*, 1979). Plus précisément la gélification des laits de bonne qualité bactériologique serait due à l'action de la plasmine (SNOEREN *et al.*, 1979 ; DE KONING *et al.*, 1985), alors que celle des laits de mauvaise qualité serait due essentiellement à la présence de protéases thermostables synthétisées par des bactéries psychrotrophes s'étant développées lors de la conservation du lait dans des tanks réfrigérés (SNOEREN *et al.*, 1979). Toutefois selon HARWALKAR et VREEMAN (1978), gélification et taux de protéolyse ne seraient pas directement liés. En effet, la présence de polyphosphates retarde la gélification de laits UHT concentrés sans toutefois modifier le taux de protéolyse. Ces auteurs en concluent que la protéolyse ne serait pas le facteur prédominant dans la gélification et ne constituerait que la phase primaire du processus de gélification. Une autre hypothèse, suggérée par ANDREWS (1975), expliquerait le phénomène de gélification par une polymérisation des caséines et des protéines du lactosérum consécutive à la formation de réactions de Maillard lors du traitement thermique.

La protéolyse due à la plasmine a également été rendue responsable de l'apparition de goûts amers lors du stockage des laits pasteurisés (72° C - 20 secondes) (SUHREN, 1983) et des laits UHT (DRIESSEN, 1983). Selon DRIESSEN, le temps de stérilisation plus que la température de stérilisation revêt une importance dans l'apparition de mauvais goûts dans les laits UHT. Un temps de stérilisation court, conjugué à une augmentation de la protéolyse entraîne l'apparition de goûts amers.

En fabrication fromagère, la protéolyse par la plasmine peut également avoir des incidences technologiques. On considère toutefois que son action au cours de l'affinage est relativement faible. Des expériences effectuées sur des caillés expérimentaux de type gouda (pH 5,2) ne contenant ni présure ni micro-organismes, ont montré qu'après 6 mois d'affinage le taux de protéolyse représente 12 % de la protéolyse totale des fromages témoins (VISSER, 1977). Cette protéolyse se traduit en particulier par l'hydrolyse de la caséine β et l'augmentation des teneurs en caséines γ des caillés. Son action dans les fromages est fonction du pH de la pâte. Par exemple, en

fin d'affinage, elle s'intensifie dans la zone externe du camembert car le pH est alors plus élevé et proche de son optimum d'action (TRIEU-CUOT et GRIPON, 1982). Notons également les fromages à pâte cuite dans lesquels la quasi totalité des protéases coagulantes est inactivée par le chauffage et où la plasmine résiduelle joue probablement un rôle plus important que dans les autres fromages (GARNOT, COLLIN et GRAPPIN, communication personnelle). Les conséquences de fortes teneurs en plasmine en fromagerie sont mal connues. Il a été signalé que les laits de fin de lactation donnent des fromages de qualité médiocre dont la teneur en eau trop élevée suggère une mauvaise synérèse (Fox, 1981). Toutefois, les influences d'une forte protéolyse par la plasmine sur les propriétés rhéologiques du gel et la synérèse ne sont pas connues.

II. Protéases des bactéries psychrotrophes

Le lait contient une grande variété de micro-organismes capables de synthétiser des protéases. La réfrigération du lait dès la ferme et son stockage pendant un temps plus ou moins long sélectionne des bactéries psychrotrophes qui peuvent devenir alors la flore dominante. Parmi ces bactéries le genre *Pseudomonas* est le plus fréquent. Bien que ces bactéries soient détruites par la pasteurisation, elles peuvent avoir sécrété auparavant des protéases exocellulaires et thermorésistantes, capables de dégrader les constituants du lait et d'occasionner des défauts en cours de stockage.

A. Production

Il existe, à l'heure actuelle, peu de travaux permettant d'établir une corrélation valable entre le nombre des bactéries psychrotrophes et la production de protéases. LAW *et al.* (1977) ne décèlent pas d'activité protéolytique avec la souche de *Ps. fluorescens* AR11, pour un taux de l'ordre de $8,0 \cdot 10^5$ germes/ml. ADAMS *et al.* (1976) constatent une dégradation du lait UHT lorsque le taux de bactéries dans le lait cru excède 10^8 germes/ml. COUSIN et MARTH (1977) observent une protéolyse dans des laits pasteurisés obtenus à partir de lait cru contenant un nombre total de *Pseudomonas* de l'ordre de $4,0 \cdot 10^6$ germes/ml.

La synthèse de protéases exocellulaires par les bactéries psychrotrophes s'effectue pendant la phase exponentielle de la courbe de croissance (ADAMS *et al.*, 1975) et le maximum de production a lieu en fin de phase exponentielle et au début de la phase stationnaire (ROWE et GILMOUR, 1982).

L'addition de poudre de lait (Mc KELLAR, 1982), de caséines (PATEL *et al.*, 1983 a) ou d'acides aminés libres (Mc KELLAR, 1982)

à des milieux synthétiques ou complexes entraîne une forte augmentation de la production de protéases. A l'inverse, la présence d'agents chélateurs semble inhiber la formation de protéases dans le milieu (Mc KELLAR et CHOLETTE, 1985).

La plupart des souches de *Ps. fluorescens* semblent être plus protéolytiques lorsqu'elles se développent à des températures comprises entre 20 et 25° C et moins protéolytiques à des températures comprises entre 5 et 8° C (KIELWEIN, 1975 ; JUFFS, 1976 ; Mc KELLAR, 1982 ; SUHREN, 1983). Toutefois, selon JUFFS *et al.* (1968) et Mc KELLAR et CHOLETTE (1984) certaines souches de *Ps. fluorescens* seraient susceptibles de produire une plus forte quantité de protéases à basse température.

L'aération du milieu de culture peut également avoir une influence sur la production de protéases (KEEN et WILLIAMS, 1967 ; TE WHAITI et FRYER, 1978).

B. Propriétés (tabl. 2)

Un certain nombre de protéases exocellulaires sécrétées par les *Pseudomonas* ont été isolées et caractérisées partiellement (BARRACH *et al.*, 1976a ; ALICHANIDIS et ANDREWS, 1977 ; STEPANIAK *et al.*, 1982 ; RICHARDSON, 1981 ; PATEL *et al.*, 1983 b ; STEPANIAK et FOX, 1985). Il semble que ce soit, pour la plupart, des métalloprotéases qui sont inhibées par l'E.D.T.A. ou par d'autres agents chélateurs.

Les poids moléculaires observés pour ces protéases sont compris entre 23 000 et 50 000 daltons. Bien que l'échelle de poids moléculaires soit assez étendue, il semblerait d'après RICHARDSON (1981) que ces protéases existent exclusivement sous forme de monomère.

1. Spécificité (fig. 1)

Les données concernant l'action des protéases de bactéries psychrotrophes sur les protéines du lait sont beaucoup plus succinctes que pour la plasmine et se limitent essentiellement à des études électrophorétiques de cultures sur lait. Malgré la grande variété de souches de bactéries psychrotrophes pouvant être présentes dans le lait, il semble que les protéases sécrétées par ces micro-organismes aient des actions assez voisines.

LAW *et al.* (1977) ont observé, outre la disparition quasi totale de la caséine χ , une forte dégradation de la caséine β et une faible diminution de l'intensité de coloration de la caséine α_{s1} . ADAMS *et al.* (1976) ont constaté, pour neuf souches différentes de *Pseudomonas*, une baisse d'intensité des bandes correspondant aux caséines β et χ . L'attaque de la caséine χ était plus rapide que celle de la caséine β , la caséine α_{s1} restant beaucoup moins dégradée. Pour deux souches de psychrotrophes isolées du lait, MILLIÈRE et VEILLET-PONCET (1979) constatent que la caséine β est dégradée plus rapidement que la

TABLEAU 2

Propriétés caractéristiques de quelques protéases
de bactéries psychrotrophes

Characteristic properties of some proteinases
of psychrotrophic bacteria

	<i>pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> B52	<i>pseudomonas</i> sp. MC60	<i>pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> AFT36	<i>pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> AR-11	<i>pseudomonas</i> sp. AFT21		
					I	II	III
température optimale (°C)	45-50	35	45	45	45-47,5	45-47,5	45-47,5
pH optimal	7,0	7-8	6,5	6,5	7,2-7,5	7,0-7,5	8,5
activité résiduelle (%):							
-EDTA 10 ⁻⁴ M	0	20	0-30	>100	22	1,5	5,6
-réactif des groupes SH	100	n.d.	0-30	45-85	100	100	100
Poids moléculaire	46900	48000	46200	38400	46200	47000	46200
teneur en métaux:							
(atome/molécule de protéine)							
-calcium (Ca ⁺⁺)	8,1	4,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-zinc (Zn ⁺⁺)	7,0	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
stabilité thermique:							
(temps de 1/2 vie en sec.)							
-à 150°C	10,4(a) 37,5(b)	2,0(c)	8,5(d)	9,0(e)	n.d.	n.d.	15,8(f) 11,0(g)
-à 140°C	n.d.	n.d.	17,4(f)	17,0(g)	13,6(f) 5,2(g)	5,8(f) 3,6(g)	25,5(f) 17,0(g)

a= tampon TRIS-HCl 0,02 M pH 7,4 CaCl₂ 0,01 M; b= lait; c= déterminé à 149°C, tampon sans calcium; d= tampon simulant la composition saline du lactosérum; e= tampon phosphate 0,05 M pH 6,5; f= tampon simulant l'ultrafiltrat de lait (avec Ca⁺⁺) pH 6,6; g= tampon phosphate 0,1M pH 6,6 (sans Ca⁺⁺).

références bibliographiques :

B52 : RICHARDSON et TE WHAITI, 1978; RICHARDSON, 1981.; MC60 : ADAMS *et al.*, 1975; BARRACH *et al.*, 1976a; WEST *et al.*, 1978.; AFT36 : STEPANTAK *et al.*, 1982.; AR11 : ALTCHANIDIS et ANDREWS, 1977.; AFT21 : STEPANTAK et FOX, 1985

caséine α_{s1} . RICHARDSON et TE WHAITI (1978) ont observé une grande analogie dans le mode d'hydrolyse de la caséine entière par les protéases de 8 souches de bactéries psychrotrophes. Dans tous les cas, la caséine χ est rapidement hydrolysée en un produit de même comportement électrophorétique que la paracaseïne χ . La caséine β est attaquée plus lentement que la caséine χ avec apparition de produits de dégradation de mobilité électrophorétique comparable à celle des caséines γ . La caséine α_{s1} est hydrolysée elle même plus lentement que la caséine β .

Les protéines du lactosérum semblent être résistantes à l'action de ces protéases. Leur dégradation n'a pas été observée par LAW *et al.* (1977), COUSIN et MARTH (1977), RICHARDSON et TE WHAITI (1978), MILLIÈRE et VEILLET-PONCET (1979). Toutefois ADAMS *et al.* (1976) ont observé que certaines souches de *Pseudomonas* pouvaient dégrader l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline après un stockage du lait pendant 13 jours à 5° C.

De l'ensemble de ces données, il ressort que la caséine χ est hydrolysée plus rapidement que la caséine β , elle même hydrolysée plus rapidement que la caséine α_{s1} . L'hydrolyse de la caséine χ entraîne l'apparition d'un produit de dégradation de mobilité électrophorétique semblable à celle de la paracaseïne χ . L'hydrolyse de la caséine β semble correspondre à l'apparition de produits de dégra-

FIG. 1

Electrophorèse à pH alcalin en présence d'urée et de 2-mercapto-éthanol, effectuée sur des échantillons de lait réfrigéré prélevés à différents temps de conservation. (TRIEU-CUOT, résultats non publiés). P : produits de dégradation due à l'action des protéases de bactéries psychrotrophes. Les principaux produits de dégradation dues à l'action de la plasmine sont les caséines γ_1 , γ_2 et γ_3 .

Alcaline pH electrophoresis in presence of urea and 2-mercapto-ethanol of refrigered milk samples collected after different storage periods (TRIEU-CUOT unpublished results). P : degradation products due to the action of psychrotrophic proteinases. The main degradation products due to the action of plasmin are γ_1 , γ_2 and γ_3 -casein.

dation de mobilité semblable à celle des caséines γ . Un certain nombre d'autres produits de dégradation des caséines, moins spécifiques, apparaissent également. Parmi ces produits certains ont une mobilité inférieure à celle des caséines γ_2 et γ_3 et d'autres une mobilité supérieure à celle de la caséine α_{s1} .

2. Température et pH optimum

La température optimale d'activité des protéases de *Pseudomonas* se situe entre 35 et 50° C (ADAMS *et al.*, 1975 ; ALICHANIDIS et ANDREWS, 1977 ; RICHARDSON, 1981). Autour de cet optimum de température l'activité protéolytique décroît considérablement. Cependant, une activité résiduelle, non négligeable, peut persister et provoquer une dégradation des constituants du lait lors du stockage. La protéase de *Ps. fluorescens* B52 dont la température optimale se situe aux environs de 50° C (RICHARDSON, 1981), conserve 29 % de son activité à 25° C. Selon ADAMS *et al.* (1975) 25 % de l'activité maximum de certaines protéases de bactéries psychrotrophes persiste à température ambiante. La protéase de *Ps. fluorescens* AFT 36 conserve 30 % de son activité maximum à 7° C et environ 16 % à 4° C (STEPANIACK *et al.*, 1982). DRIESSEN (1976) avec la souche de *Ps. fluo-*

rescens 22F dont l'optimum de température se situe à 50° C, observe à 4° C une activité résiduelle de l'ordre de 25 %.

Selon les souches, le pH optimum d'action des protéases de bactéries psychrotrophes se situe entre 6,5 et 8,0 (MAYERHOFER *et al.*, 1973 ; ADAMS *et al.*, 1975 ; ALICHANIDIS et ANDREWS, 1977). Ces enzymes ont donc une très forte activité au pH des laits normaux. Selon RICHARDSON et TE WHAITI (1978), les protéases de 8 souches différentes de psychrotrophes isolées de lait cru présentent une bonne stabilité à 4° C entre pH 3,0 et pH 11,0. DRIESSEN (1976) avec la souche de *Ps. fluorescens* 22 F, dont le pH optimum est de 7,0, retrouve plus de 67 % de l'activité maximum entre pH 4,7 et pH 9,0. Avec la souche de *Ps. fluorescens* AR 11, dont le pH optimum est 6,5, ALICHANIDIS et ANDREWS (1977) retrouvent 30 % de cette activité à pH 5,0 et à pH 8,0 et environ 10 % à pH 9,0. Bien que la protéase de *Ps. fluorescens* B 52 ait un maximum d'activité à pH 7,0 (RICHARDSON, 1981), elle conserve 70 % de son activité entre pH 6,0 et pH 10,5. De même, avec la souche de *Ps. fluorescens* AFT 36 (STEPANIAK *et al.*, 1982), la protéase dont le pH optimum est 6,5, conserve plus de 50 % de son activité maximum entre pH 5,5 et pH 8,0.

C. Effet du chauffage sur l'activité protéolytique : thermostabilité

La plupart des protéases de bactéries psychrotrophes résistent aux températures élevées et ne sont que partiellement détruites par différents traitements de stérilisation UHT (120 à 150° C, 5 à 20 secondes) (ADAMS *et al.*, 1975 ; ALICHANIDIS et ANDREWS, 1977 ; TE WHAITI et FRYER, 1978 ; DRIESSEN, 1983). Certaines de ces protéases possèdent toutefois un maximum d'instabilité au voisinage de 55° C et la possibilité d'utiliser des chauffages à basse température pour les inactiver a été envisagée (BARRACH *et al.*, 1976 b). Un chauffage de 10 min à 55° C sur des protéases purifiées de *Pseudomonas* détruit plus de 90 % de l'activité protéolytique. L'inactivation dans le lait est plus lente mais atteint 70 % après un traitement de 1 h à 55° C. Selon WEST *et al.* (1978) un chauffage de 60 min à 55° C permet une inactivation de l'ordre de 87 à 90 % de ces protéases dans le lait. Pour des laits ayant un faible taux de protéases, ce traitement s'avère plus efficace lorsqu'il est effectué après le traitement de stérilisation.

D. Incidences technologiques

De nombreux travaux ont établi une relation entre la présence de protéases thermostables de bactéries psychrotrophes et l'altération de la durée de vie du lait UHT. Celle-ci se manifeste par l'apparition de goûts amers (BENGTSOON *et al.*, 1973 ; RICHARDSON et NEWSTEAD, 1979 ; Mc KELLAR *et al.*, 1984) et de phénomènes de géli-

fication (ADAMS *et al.*, 1976 ; BENGTSOON *et al.*, 1973 ; LAW *et al.*, 1977 ; SNOEREN *et al.*, 1979).

Mc KELLAR *et al.* (1984) ont observé une corrélation significative entre l'augmentation du niveau de protéolyse dans des laits UHT au cours de leur stockage non réfrigéré et l'apparition d'amertume. Selon RICHARDSON et NEWSTEAD (1979) l'addition de très faibles quantités de protéases dans des laits, avant traitement UHT, de l'ordre de 1 à 2 ng d'enzyme par ml de lait, sont suffisantes pour créer une amertume après 3 mois de conservation à 30° C. La présence de goûts amers au cours de la conservation de laits pasteurisés a été également attribuée à l'action des protéases de bactéries psychrotrophes (YAN *et al.*, 1983 a). PATEL et BLANKENAGEL (1972) ont constaté le développement d'amertume pour des laits contenant avant pasteurisation plus de 10^7 bactéries/ml et conservés 2 semaines à 7° C.

La gélification apparaît après le développement de l'amertume et un décalage de 6 à 10 semaines entre les 2 phénomènes a été observé (Mc KELLAR *et al.*, 1984). Le moment de la gélification dépend de la quantité de protéases présente dans le lait avant traitement UHT. Des concentrations de l'ordre de 10 à 20 ng/ml seraient suffisantes pour entraîner une coagulation en 4 à 6 semaines (RICHARDSON et NEWSTEAD, 1979). Le développement d'une souche de *Pseudomonas* au taux de $5,0 \cdot 10^7$ ou $8,0 \cdot 10^6$ bactéries/ml conduit à la gélification après respectivement 10 à 14 jours et 8 à 10 semaines de stockage à 20° C. Par contre des laits non inoculés ne contenant seulement que $8,0 \cdot 10^5$ bactéries/ml ne coagulent pas pendant au moins 20 semaines (LAW *et al.*, 1977). La stérilisation indirecte conduit à une protéolyse plus faible que la stérilisation directe (MOTTAR *et al.*, 1979 ; SNOEREN et BOTH, 1981 ; CORRADINI et PECCHINI, 1981 ; Mc KELLAR *et al.*, 1984) ce qui a été attribué au chauffage plus intense du traitement indirect et à une plus grande inactivation des protéases (MOTTAR *et al.*, 1979). Mc KELLAR *et al.* (1984) ont observé que des laits traités par la méthode directe gélifient plus rapidement que des laits traités par la méthode indirecte.

Les protéases des bactéries psychrotrophes interviennent également en fromagerie où elles sont à l'origine de pertes d'azote dans le lactosérum et de diminution du rendement fromager. Toutefois, les résultats concernant les niveaux de contamination provoquant ces pertes ne sont pas toujours concordants et demandent à être précisés. En fabrication de pâtes molles FEULLAT *et al.* (1976) ont observé que des taux de l'ordre de 10^6 bactéries/ml provoquent des pertes de rendement en matière azotée notables (de l'ordre de 5 %). De même le rendement en cottage cheese diminue lorsque les taux en bactéries psychrotrophes excèdent 10^6 bactéries/ml (AYLWARD *et al.*, 1980, MOHAMED et BASSETTE, 1979). Inversement LAW *et al.* (1979) n'ont pas observé de perte d'azote dans le sérum ou de baisse de rendement au cours de la fabrication du cheddar contenant 10^7 bactéries/ml. Plus récemment et sur des caillés modèles YAN *et al.* (1983 b) ont mis en évidence des diminutions de rendement avec

des laits conservés 4 jours à 7° C ou 6 jours à 4° C. Les populations de bactéries psychrotrophes étaient alors élevées et supérieures à 10⁸ bactéries/ml.

Conclusion

La présence d'enzymes protéolytiques, quelle que soit leur origine, peut entraîner une détérioration des laits UHT et pasteurisés lors de leur conservation. Elle peut également avoir des répercussions en fromagerie. La protéolyse dans le lait apparaît donc comme un problème important en industrie laitière.

Pour diminuer l'effet des protéases natives du lait au cours de la conservation des laits UHT, ZADOW et CHITUTA (1975) suggèrent une augmentation soit de la température (150° C) soit de la durée de chauffage. DRIESSEN et VAN DER WAALS (1978) préconisent pour leur part, l'utilisation d'un temps de chauffage d'au moins 16 secondes pour la stérilisation UHT à 142° C. Un prétraitement du lait à basse température (60 min, 55° C) semble, en outre, pouvoir améliorer l'efficacité de ce traitement thermique (DRIESSEN, 1983). Cependant, si elle diminue l'action des protéases natives, l'intensification des traitements thermiques peut entraîner une altération des qualités organoleptique et nutritionnelle du produit.

En ce qui concerne les protéases bactériennes, l'utilisation d'un prétraitement thermique à basse température permet également d'améliorer l'efficacité d'un chauffage ultérieur plus intense (BARRACH *et al.*, 1976 b). Toutefois DRIESSEN (1983) considère que le moyen le plus efficace pour diminuer la protéolyse due aux enzymes bactériennes, réside dans une amélioration de la qualité bactériologique du lait à la collecte, suivi d'un stockage réfrigéré (< 4° C) d'une durée maximum inférieure à 3 jours.

Summary

Origin, nature and technological significance of proteolysis in milk

Cow milk contains different proteolytic enzymes which may cause alterations of milk constituents. Some of them are naturally present in milk, some are secreted by microorganisms. Moreover, enzymes can be liberated in case of udder infection when cells and cell structures are destroyed by pathogenic bacteria. This review is concerned in particular with plasmin and some proteinases from psychrotrophic bacteria. Data regarding their level, their proteolytic activity and the factors of variation of this activity are outlined as well as their technological significance.

Key words : Proteolysis - Plasmin - Proteinase - Psychrotrophic - Milk.

Références bibliographiques

- ADAMS D.M., BARRACH J.T., SPECK M.L., 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.*, 58, 828-834.
- ADAMS D.M., BARRACH J.T., SPECK M.L., 1976. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins on ultra high temperature treatment. *J. Dairy Sci.*, 59, 823-827.
- AIMUTIS W.R., EIGEL W.N., 1982. Identification of λ -casein as plasmin derived fragments of bovine α_{s1} -casein. *J. Dairy Sci.*, 65, 175-181.
- ALICHANIDIS E., ANDREWS A.T., 1977. Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* AR11. *Biochim. Biophys. Acta*, 485, 424-433.
- ANDREWS A.T., 1975. Properties of aseptically packed Ultra-high-temperature milk. III. Formation of polymerized proteins during storage at various temperature. *J. Dairy Res.*, 42, 89-92.
- ANDREWS A.T., 1978 a. The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, 90, 59-65.
- ANDREWS A.T., 1978 b. The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, 90, 67-71.
- ANDREWS A.T., 1983. Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin. *J. Dairy Res.*, 50, 57-66.
- ANDREWS A.T., ALICHANIDIS E., 1983. Proteolysis of casein and the proteoses peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.*, 50, 275-290.
- AYLWARD E.B., O'LEARY T., LANGLOIS B.E., 1980. Effect of milk storage on cottage cheese yield. *J. Dairy Sci.*, 63, 1819-1825.
- BARRACH J.T., ADAMS D.M., SPECK M.L., 1976 a. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultra high temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 875-879.
- BARRACH J.T., ADAMS D.M., SPECK M.L., 1976 b. Low temperature inactivation in milk of heat resistant proteases from psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Sci.*, 59, 391-395.
- BARRY J.G., DONNELLY W.T., 1981. Casein compositional studies. III. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. *J. Dairy Res.*, 48, 437-446.
- BENGTSOON K.L., GARDHAGE L., ISAKSOON B., 1973. Gelation in UHT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistant proteases. *Milchwissenschaft*, 28, 495-499.
- CORRADINI C., PECCHINI G., 1981. Effect on proteinases of different UHT treatments. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 393-395.
- COUSIN M.A., 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products : A review. *J. Food Prot.*, 45 (2), 172-207.
- COUSIN M.A., MARTH E.H., 1977. Changes in milk protein caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft*, 32, 337-341.
- DE KONING P.J., KAPER J., ROLLEMA H.S., DRIESSEN F.M., 1985. Age-thinning and gelation in unconcentrated and concentrated UHT-sterilized skim-milk. Effect of native milk proteinase. *Neth. Milk Dairy J.*, 39, 71-87.
- DE RHAM O., ANDREWS A.T., 1982. The roles of native milk proteinase and its zymogen during proteolysis in normal bovine milk. *J. Dairy Res.*, 49, 577-585.
- DONNELLY W.J., BARRY J.G., 1983. Casein compositional studies. III. Changes in Irish milk for manufacturing and role of milk proteinases. *J. Dairy Res.*, 50, 433-441.

- DRIESSEN F.M., 1976. Eiwitafbraak in stromend gesteriliseerde melk en melkproducten. *Zwivelzicht*, 68, 514-515.
- DRIESSEN F.M., 1983. Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milk products. Thesis September 1983. Verslag V 236. Nederlands Instituut voor Zwivelonderzoek.
- DRIESSEN F.M., VAN DER WAALS, C.B., 1978. Inactivation of native milk proteinase by heat treatment. *Neth. Milk Dairy J.*, 32, 245-254.
- DULLEY J.R., 1972. Bovine milk proteinases. *J. Dairy Res.*, 39, 1-9.
- EIGEL W.N., 1977 a. Formation of $\gamma 1-A^2$, $\gamma 2-A^2$ et $\gamma 3-A^2$ caseins by *in vitro* proteolysis of β casein A^2 with bovine plasmin. *Int. J. Biochem.*, 8 (3), 187-192.
- EIGEL W.N., 1977 b. Effect of bovine plasmin on $\alpha_{s1}-B$ casein and $\chi-A$ caseins. *J. Dairy Sci.*, 60, 1399-1403.
- EIGEL W.N., HOFMAN C.J., CHIBBER B.A.K., TOMICH J.M., KEENAN T.W., MUTZ E.T., 1979. Plasmin mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 2244-2248.
- FEUILLAT M., LE GUENNEC S., OLSSON A., 1976. Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromages à pâte molle. *Lait*, 56, 521-536.
- FOX P.F., 1981. Proteinases in dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 233-253.
- GALLIMORE M.J., 1979. The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis, p. 199-217. Edited by Collen D., Wiman B., Verstraete M., Elsevier North Holland Biomedical Press.
- JUFFS H.S., 1976. Effects of temperature and nutrients on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* in broth and milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 40, 23-32.
- JUFFS H.S., HAYWORD A.C., DOELLE H.W., 1968. Growth and proteinase production in *Pseudomonas* spp. cultivated under various conditions of temperature and inhibition. *J. Dairy Res.*, 35, 385-393.
- HARWALKAR V.R., VREEMAN H.J., 1978. Effect of added phosphates and storage on changes in ultra-high temperature short time sterilized concentrated skim milk. 1. Viscosity, gelation, alcohol stability, chemical and electrophoretic analysis of proteins. *Neth. Milk Dairy J.*, 32, 94-111.
- HUMBERT G., ALAIS C., 1979. Review of the progress of Dairy Science : the milk proteinase system. *J. Dairy Res.*, 46, 559-571.
- KAMINOGAWA S., MIZOBUCHI H., YAMAUCHI K., 1972. Comparison of bovine milk protease with plasmin. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2163-2167.
- KAMINOGAWA S., YAMAUCHI K., 1972. Acid protease of bovine milk. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2351-2356.
- KAMINOGAWA S., YAMAUCHI K., TSUGO T., 1969. Properties of milk protease concentrated from acid precipitated casein. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 40, 559-565.
- KEEN N.T., WILLIAMS P.H., 1967. Effect of nutritional factors on extracellular protease production by *Pseudomonas lachrymans*. *Can. J. Microbiol.*, 13, 863-871.
- KIELWEIN G., 1975. Proteolyse von milch und milchprodukten durch *Pseudomonas fluorescens*. *Milchwissenschaft*, 30, 605-606.
- KITCHEN B.J., 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis : milk compositional changes and related diagnostic test. *J. Dairy Res.*, 48, 167-188.
- KORYCKA-DAHL M., RIBADEAU-DUMAS B., CHENE N., MARTAL J., 1983. Plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 704-711.
- LAW B.A., 1979. Reviews of the progress of dairy science : enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.*, 46, 573-588.

- LAW B.A., ANDREWS A.T., CLIFFE A.J., SHARPE M.E., CHAPMAN M.R., 1979. Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on Cheddar cheese making with stored milk. *J. Dairy Res.*, 46, 497-509.
- LAW B.A., ANDREWS A.T., SHARPE M.E., 1977. Gelation of ultra high temperature sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *J. Dairy Res.*, 44, 145-178.
- MAYERHOFER H.J., MARSHALL R.T., WHITE C.H., LU M., 1973. Characterization of heat stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P 26. *Appl. Microbiol.*, 25, 44-48.
- Mc KELLAR R.C. 1982. Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Bacteriol.*, 53, 305-316.
- Mc KELLAR R.C., CHOLETTE H., 1984. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen and phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1224-1227.
- Mc KELLAR R.C., CHOLETTE H., 1985. Inhibition by chelating agents of the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* 32 A. *J. Dairy Res.*, 52, 91-100.
- Mc KELLAR R.C., FROEHLIOM D.A., BUTLER G., CHOLETTE H., CAMPBELL C., 1984. The effect of uncooled storage on proteolysis bitterness and apparent viscosity in UHT milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. Quarterly J.*, 17, 14-17.
- MILLIÈRE J.B., VEILLET-PONCET L., 1979. Détermination de la flore bactérienne caséolytique psychrotrophe des laits crus réfrigérés. *Lait*, 59, 56-78.
- MOHAMED F.O., BASSETTE R., 1979. Quality and yield of cottage cheese influenced by psychrotrophic microorganisms in milk. *J. Dairy Sci.*, 62, 222-226.
- MOTTAR J., WAES G., NOERMANS R., NAUDTS M., 1979. Sensoric changes in UHT milk during uncooled storage. *Milchwissenschaft*, 34, 257-262.
- NOOMEN A., 1975. Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 153-161.
- PATEL T.R., BARLETT F.M., HAMID J., 1983 a. Extracellular heat-resistant protease of psychrotrophic pseudomonads. *J. Food Prot.*, 46, 90-94.
- PATEL G.B., BLANKENAGEL G., 1972. Bacterial counts of raw milk and flavor of the milk after pasteurisation and storage. *J. Milk Food Technol.*, 35, 203-206.
- PATEL T.R., JACKMAN D.M., BARTLETT F.M., 1983 b. Heat stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T 16 : purification by affinity column chromatography and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (2), 333-337.
- PAYENS T.A.J., 1978. On different modes of casein clotting : the kinetics of enzymatic and non enzymatic coagulation compared. *Neth. Milk Dairy J.*, 32, 170-183.
- REIMERDES E.H., 1983. New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 1591-1600.
- REIMERDES E.H., HALPAAP J., KLOSTERMEYER H., 1981. Milch proteinasen. VIII. Vergleichende charakterisierung von plasmin aus rinderblut mit einer serin-proteinase aus kuhmilch. *Milchwissenschaft*, 36, 19-22.
- REIMERDES E.H., HERLITZ E., 1979. The formation of γ -caseins during cooling of raw milk. *J. Dairy Res.*, 46, 219-221.
- REIMERDES E.H., MROWETZ G., KLOSTERMEYER H., 1975. Milchproteasen. IV. Differenzierung der micellenassoziierten aktivitat mit aminosäure-4-nitroaniliden. *Milchwissenschaft*, 30, 271-274.
- REIMERDES E.H., PETERSEN F., KIELWEIN, 1979. Milchproteinasen. 9. Proteinases pekten von casein micellen, milchserum, rinderblutserum und *Pseudomonas fluorescens*. *Milchwissenschaft*, 34, 548-551.
- RICHARDSON B.C., 1981. The purification and characterization of heat stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B 52. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 16, 195-207.

- RICHARDSON B.C., 1983. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 18, 233-245.
- RICHARDSON B.C., NEWSTEAD D.F., 1979. Effect of heat-stable proteases on storage life of UHT milk. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 14, 273-279.
- RICHARDSON B.C., PEARCE K.N., 1981. The determination of plasmin in dairy products. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 16, 209-220.
- RICHARDSON B.C., TE WHAITI I.E., 1978. Partial characterization of heat stable extracellular proteases of some psychrotrophic bacteria from milk. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 13, 172-176.
- RICHTER R.L., SCHMIDT R.H., SMITH K.L., MULL L.E., HENRY S.L., 1977. Proteolytic activity in ultra pasteurized aseptically packaged bitter cream. *J. Dairy Sci.*, 60 (1), 169-170.
- ROLLEMA H.S., VISSER S., POLL J.K., 1983. Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk. *Milchwissenschaft*, 38, 214-217.
- ROWE M.T., GILMOUR A., 1982. Growth, enzyme production and changes in oxygen tension occurring during batch cultivation of psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* strains. *Milchwissenschaft*, 37, 597-643.
- SHAHANI K.M., HARPER W.J., JENSEN R.G., PARRY R.M., ZITTE C.A., 1973. Enzymes in bovine milk : a review. *J. Dairy Sci.*, 56, 531-543.
- SNOEREN T.M.H., BOTH P., 1981. Proteolysis during the storage of U.H.T.-sterilized whole milk. II. Experiments with milk heated by the indirect system for 4 sec. at 142° C. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 113-119.
- SNOEREN T.M.H., VAN DER SPECK C.A., DEKKER R., VOTH P., 1979. Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk. I. Experiments with milk heated by the direct system for 4 sec. at 142° C. *Neth. Milk Dairy J.*, 33, 31-39.
- SNOEREN T.M.H., VAN RIEL J.A.M., 1979. Milk proteinase, its isolation and action in α_s - and β -casein. *Milchwissenschaft*, 34, 528-531.
- SNOEREN T.M.H., VAN RIEL J.A.M., BOTH P., 1980. Some properties of a milk proteinase isolated from UHT milk. *Zuivelzucht*, 72, 42-43.
- STEPANIAK L., FOX P.F., 1985. Isolation and characterization of heat stable proteinases from *Pseudomonas* isolate AFT 21, *J. Dairy Res.*, 52, 77-89.
- STEPANIAK L., FOX P.F., DALY C., 1982. Isolation and general characterization of the heat stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36. *Biochim. Biophys. Acta*, 717, 376-383.
- SUHREN G., 1983. Occurrence and levels of heat resistant proteinases and their effects on UHT-treated dairy products. *Int. Dairy Fed. Bull. F-Doc.*, 85, 1-8.
- TE WHAITI I.E., FRYER T.F., 1978. Production and heat stability in milk of proteinases and lipases of psychrotrophic *Pseudomonas*. XX^e Int. Dairy Congr., Paris, 1978, 303-304 (Abst.).
- TOMICH J.M., EIGEL W.N., CHIBBER B.A.K., 1976. Evidence for the presence of plasminogen and plasmin in bovine milk. *Fed. Proc.*, 35, 1487.
- TRIEU-CUOT P., GRIPON J.C., 1982. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.*, 49, 501-510.
- 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 S., 1981. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 65-88.
- WEINSTEIN M.J., DOOLITTLE R.F., 1972. Differential specificities of thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 248, 577-590.

- WEST F.B., ADAMS D.M., SPECK M.L., 1978. Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra-high temperature sterilized skim milk by a low temperature treatment. *J. Dairy Sci.*, 61, 1078-1084.
- YAMAUCHI K., KAMINOGAWA S., 1972. Decomposition of milk proteins by milk protease. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 249-254.
- YAN L., LANGLOIS B.E., O'LEARY J., HICKS C., 1983 a. Effect of raw milk storage on changes during storage of pasteurised milk. *Milchwissenschaft*, 38, 658-660.
- YAN L., LANGLOIS B.E., O'LEARY J., HICKS C., 1983 b. Effect of storage conditions of grade A raw milk on proteolysis and cheese yield. *Milchwissenschaft*, 38, 715-717.
- ZADOW J.G., CHITUTA F., 1975. Age gelation of ultra-high-temperature milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 30, 104-106
-