

LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :

P. SALVADORI, B. BIANCHI et
V. CAVALLI. — Etude sur
l'attaque des acides aminés
par des *Penicillium*
employés dans la fabrication
de fromages persillés 129

Ch. ALAIS et P. JOLLÈS. —
L'action de la présure sur
la caséine (2^e partie) 138

N. PINO et L. CHIOFALO. —
Recherches sur la corrélacion
entre le poids spécifique
et la conductibilité
électrique du lait de vache 152

SUPPLÉMENT TECHNIQUE :

G. GÉNIN. — L'emploi du ca-
séinate de sodium dans la
préparation des mélanges
pour crème glacée 165

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

1^o Les livres 175

2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 179
3^o Brevets 212

BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :

1^o Les livres 217
2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 218
3^o Brevets 226

DOCUMENTS ET INFORMATIONS :

Marché commun. Règlements
intervenues à Bruxelles le
23 décembre 1963 sur le
marché du lait et des pro-
duits laitiers 230
Politique Laitière 236
Nouvelles de Grande-Bretagne
239
V^e Congrès international de
la reproduction animale et
d'insémination artificielle. 240
Institut supérieur d'Agricul-
ture 240

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

ÉTUDE SUR L'ATTAQUE DES ACIDES AMINÉS PAR DES PÉNICILLIUM EMPLOYÉS DANS LA FABRICATION DE FROMAGES PERSILLÉS

par

PIETRO SALVADORI, BRUNA BIANCHI et VINCENZINA CAVALLI

Bacteriologistes du Centro sperimentale del Latte. Milano

Avant-propos.

Aujourd'hui on fabrique le fromage Gorgonzola et les fromages persillés en général (Bresse bleue, Saingorlon, Bleu, etc.) en employant des cultures de ferments lactiques et de *Penicillium* sélectionnés.

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

Le fromage Gorgonzola produit avec les méthodes traditionnelles est demandé seulement par un nombre limité de consommateurs, tandis que la majorité s'est orientée vers un type de fromage « Crémifié » dont la pâte a une saveur délicate et douce tandis que l'arome caractéristique et la saveur piquante du vieux Gorgonzola sont sensiblement atténués.

Pour obtenir ce type de fromage il faut accoupler à une opportune technologie des ferments spéciaux sélectionnés et des souches spéciales de *Penicillium*. L'importance fondamentale dans la maturation des fromages persillés qui, aujourd'hui, a été reconnue au *Penicillium*, laisse comprendre comment cet eumycète est étudié et observé avec une particulière attention dans ses différents aspects.

Dans des précédentes recherches effectuées dans nos Laboratoires il a été pris en considération les différentes puissances protéolytiques de quelques souches de *Penicillium roqueforti* [1-2] utilisées pour la production industrielle. Parmi les différentes souches examinées on en a choisi trois ayant les caractéristiques suivantes [3] :

- Souche N : Puissance protéolysante faible,
- Souche P : Puissance protéolysante intermédiaire ;
- Souche B : Puissance protéolysante forte.

Les différentes caractéristiques des souches ont été confirmées aussi bien dans deux précédents travaux que nous avons développés en effectuant des analyses chromatographiques des mycéliums partiellement hydrolysés, qu'en effectuant des analyses chromatographiques des protéolysats en lait et en effectuant des examens des caractères culturels des colonies développées dans des milieux spécifiques.

D'après ces premières expériences il a été possible d'indiquer une méthode capable de donner plus de sûreté dans le choix des moisissures destinées à l'industrie fromagère pour la fabrication de fromages persillés avec particulière relation aux différentes technologies employées par les divers producteurs.

But de la recherche.

Comme nous l'avons déjà indiqué dans l'avant-propos, notre but est de démontrer comment l'action du *Penicillium* guide la maturation du Gorgonzola. Puisqu'il n'est pas possible d'étudier directement sur le fromage le cours de la fermentation, étant donné que d'autres facteurs étrangers à la moisissure interviennent, nous

avons cherché à reproduire en Laboratoire l'activité que nous supposons être exercée par le Pénicillium sur les protéines du lait.

Dans un de nos premiers travaux publié dans les Actes du Congrès International F.I.L. de Copenhague, nous avons mis en évidence l'attaque des protéines du lait par le Pénicillium et nous avons observé chromatographiquement les différents acides aminés s'étant produits.

Secondement nous avons étudié les acides aminés constitutifs du mycélium, pour observer les différences existant entre les différentes souches douées de caractéristiques protéolysantes différentes.

D'après nos premiers travaux nous avons remarqué que les différentes souches de Pénicillium, partiellement hydrolysées, détachent des acides aminés qui présentent souvent, dans des différents cas, des différences qualitatives. Nous allons résumer ce que nous avons observé dans nos précédents travaux :

a) Une différence de comportement dans la protéolyse des mycéliums au moyen de l'hydrolyse chimique ;

b) Une différence dans l'apparition d'acides aminés dans les protéolysats en lait par les différentes souches ;

c) Apparition dans les protéolysats en lait d'acides aminés différents des acides aminés constitutifs du lait que nous avons employé.

Ce que nous avons observé sous c) nous a amené à croire que quelques acides aminés qui n'existaient pas dans le lait employé dérivent de l'attaque, par le Pénicillium, de ceux déjà présents dans le lait ; en effet c'est sur cette observation que se base le but de notre troisième recherche. Avec cette observation, ainsi que nous l'avons déjà précédemment affirmé, nous cherchons à mettre en évidence, au moins en partie, le rôle que nous supposons être joué par le Pénicillium, durant la maturation du fromage, à l'égard de la protéine. Nous avons pris en considération, ensuite, tous les acides aminés parus durant les différentes phases digestives du lait ensemencé de Pénicillium. Au Warburg la courbe d'attaque par le Pénicillium a été étudiée pour chaque acide aminé.

Pour effectuer le présent travail nous avons dû naturellement confirmer les résultats chromatographiques de nos précédentes publications pour contrôler si entre temps les souches de Pénicillium avaient subi des mutations à cet égard.

A cause de l'étendue de ce travail il a été pris seulement en considération, pour le moment, la souche B qui a donné, dans

les protéolysats en lait, le nombre le plus élevé d'acides aminés.

D'après l'attitude de la souche B à attaquer les différents acides aminés nous avons cherché à établir avec l'étude des courbes respiratoires, un présumé équipement enzymatique constitutif et adaptatif de la souche soumise à l'examen.

Méthodes.

Le mycélium employé pour les expériences au Warburg était obtenu en maintenant en agitation des cultures de *Penicillium* en bouillon malt.

L'incubation était prolongée pendant 60 heures à 25° C. Après l'incubation, les cultures étaient filtrées sur Büchner stérile et le mycélium ainsi obtenu était dégagé de toute trace de milieu culturel au moyen de plusieurs lavages avec tampon phosphatique stérile à pH 7,3.

Le mycélium séché sur filtre était suspendu dans des erlenmeyers contenant 150 cm³ de tampon stérile à raison de 3 grammes par erlenmeyer. Sur la suspension étaient ensuite déterminés le poids sec et l'azote total. Les erlenmeyers ainsi préparés ont été divisés en trois groupes.

Un premier groupe après environ 30 mn était employé pour la première détermination au Warburg (temps 0). Les deux autres groupes étaient placés en agitation à 25° C et essayés au Warburg respectivement après 24 heures (temps 24) et après 48 heures (temps 48) pour contrôler si avec le vieillissement du mycélium, et par conséquent avec la chute de la respiration endogène, la consommation d'O₂ augmentait auprès des autres acides aminés. La suspension employée pour les preuves au Warburg était homogénéisée pendant 10 s avec appareil Ultraturrax (24 000 tours).

Dans chaque fiole était introduite une petite quantité de suspension mycéliaire correspondant à 25-30 milligrammes de mycélium sec ayant une quantité d'azote totale de 0,30-0,40 milligrammes.

Dans le diverticule latéral de la fiole étaient placées 3 micro-moles de l'acide aminé soumis à l'examen. Le choix des quantités d'acide aminé a été établi d'après des preuves préventives avec des quantités graduelles de 30 à 0,3 micro-moles par fiole.

La dose optimale moyenne pour tous les acides aminés a résulté être de 3 micro-moles.

Pour la méthodologie employée au Warburg nous renvoyons aux textes spécialisés [4].

Résultats.

Dans le tableau 1, résumant de nombreuses épreuves, sont reportées les données obtenues au Warburg pour chaque acide aminé essayé avec mycélium de Pénicillium B au temps 0 et vieilli pendant 24 et 48 heures.

TABLEAU I

Acide aminé	Temps 0	Temps 24	Temps 48
Histidine	±	±	±
Cystéine	±	±	±
Méthionine	—	—	±
Phénylalanine	—	—	—
Lysine	+	+	+
Tyrosine	±	±	±
Proline	±	±	±
Sérine	±	±	±
Isoleucine	—	±	—
Asparagine	+	+	+
Hydrossiproline	+	+	+
Valine	+	+	+
Arginine	+	+	+
Acide glutamique	+	+	+
Glycine	+	+	+
Cystine	±	—	—
Tryptophane	+	+	+
Acide aspartique	+	+	+
Leucine	—	—	—
Alanine	±	±	±
Ornithine	—	—	—

Nous avons indiqué conventionnellement du signe + la consommation d'O₂ plus haute que l'endogène dès le début de l'expérience ; au signe ± les cas où la consommation d'O₂ était plus basse que l'endogène dans les premières lectures, tandis qu'elle devenait plus haute que l'endogène dans les lectures successives ; au signe — les cas où la consommation d'O₂ a toujours résulté être plus basse que l'endogène durant toute l'expérience.

Pour simplifier, dans le tableau nous n'avons pas indiqué les valeurs en moles d'O₂ consommé.

Nous avons, au contraire, pensé qu'il était opportun de donner trois diagrammes démonstratifs se référant au cours de la consom-

mation d' O_2 dans les cas que nous avons jugés avec les signes +, \mp , -.

Dans ces diagrammes les valeurs des moles d' O_2 consommé sont le résultat moyen des valeurs obtenues dans les diverses expériences.

Sur les abscisses sont reportées les valeurs des temps, tandis que sur les ordonnées sont reportées les valeurs des molécules d' O_2 .

Pour mettre mieux en évidence les différences de respiration et conséquente utilisation de l'acide aminé essayé, les valeurs du tableau et des diagrammes ont été toujours données en ôtant l'endogène. Nous rappelons à ce propos que si l'on travaille avec des souches du genre *Penicillium* la respiration endogène résulte être très haute.

Nous avons cherché à avoir recours au vieillissement du mycélium et, en réalité, nous avons obtenu une respiration endogène plus basse; les courbes d'attaque des acides aminés, toutefois, résultaient toujours parallèles et coïncidaient avec celles du mycélium au temps 0.

Discussion et conclusions.

D'après les résultats obtenus, il paraît évident que le *Penicillium* B soumis à l'examen est capable d'attaquer immédiatement

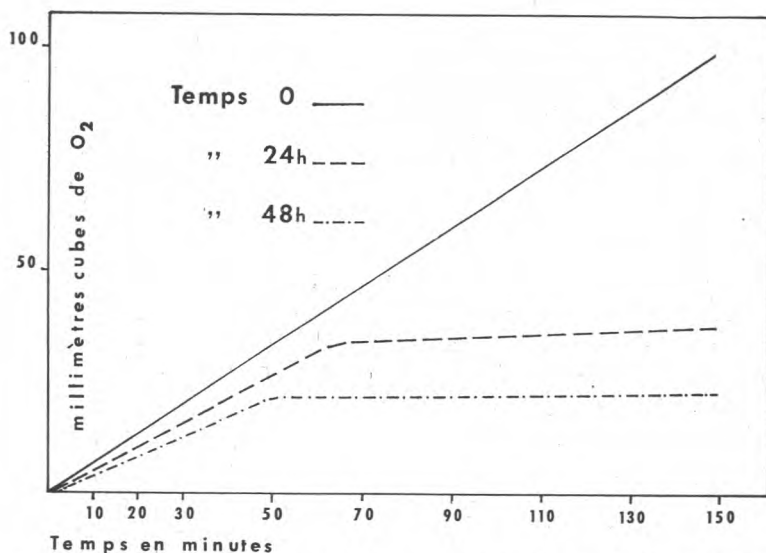


Fig. 1. — Consommation d' O_2 plus haute que l'endogène dès le début de l'expérience.

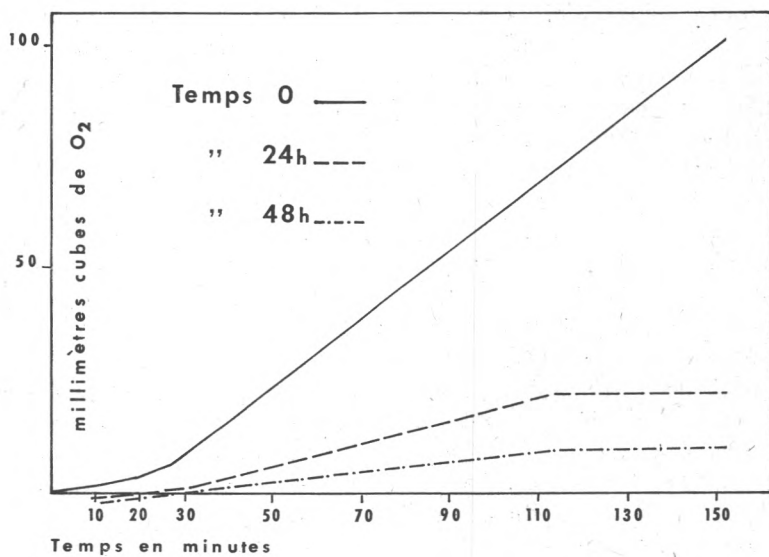


Fig. 2. — Consommation d' O_2 plus basse que l'endogène dans les premières lectures.

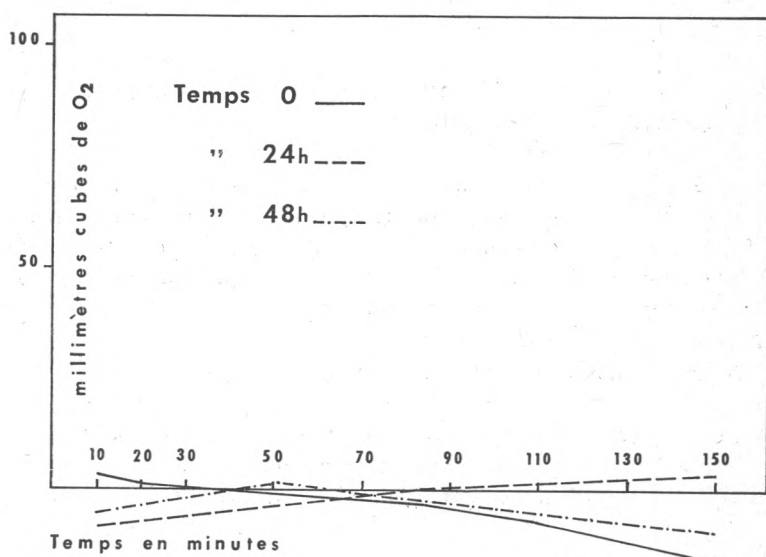


Fig. 3. — Consommation d' O_2 plus basse que l'endogène durant toute l'expérience.

quelques acides aminés tandis que d'autres acides aminés sont attaqués seulement après un certain délai, quelques autres acides aminés, enfin, ne sont pas attaqués ou ils le sont en quantité négligeable ou nous parvenons jusqu'au point d'observer une inhibition auprès de la respiration endogène.

Parmi les acides aminés utilisés nous remarquons en grande partie ceux qui, dans les travaux précédents, résultaient être présents dans les mappes chromatographiques des protéolysats mais qui, durant les divers prélèvements, pouvaient aussi disparaître. Il s'agit de la lysine, de l'apargine, de l'hydrossiproline, de la valine, de l'arginine, de l'acide glutamique, de la glycine, de l'acide aspartique, du tryptophane.

Ceci devrait être une première confirmation de nos hypothèses que quelques acides aminés étant produits de la dégradation de la caséine seraient réutilisés par le *Penicillium* pour opérer des processus métaboliques. Cela nous amène à supposer que l'équipement enzymatique du *Penicillium* porte des enzymes constitutifs capables d'attaquer immédiatement ces acides aminés.

Toujours d'après ce tableau nous voyons que quelques acides aminés sont attaqués par le *Penicillium* seulement après un certain temps.

Ce retard dans l'attaque de l'histidine, de la cystéine, de la tyrosine, de la proline, de la sérine, de l'alanine laisse penser à une adaptation de la souche à un acide aminé déterminé et pour cela à la préparation grâce au *Penicillium*, d'enzymes adaptatifs.

Le fait d'avoir gardé quelques mycéliums en tampon 24 et 48 heures avant de les essayer au Warburg, n'a pas donné des variations sensibles dans le temps.

Quelques acides aminés ne sont pas attaqués ou ils parviennent au point d'inhiber le processus respiratoire, comme la méthionine, la phénylalanine, l'isoleucine, la cystine, la leucine, l'ornithine.

Probablement l'hydrolyse de ces acides aminés de la maturation des fromages persillés a lieu à la suite de processus métaboliques produits par des micro-organismes différents du *Penicillium* ou en symbiose avec le *Penicillium*.

En nous basant sur la connaissance que jusqu'ici nous avons acquise sur la structure de la molécule de la caséine, nous pouvons avancer deux hypothèses dérivant de nos expériences, soit sur l'apparition et la disparition de quelques acides aminés constitutifs du lait, soit sur l'apparition d'acides aminés différents de ceux du lait.

Première hypothèse.

La disparition et la réapparition de quelques acides aminés

peuvent être causées par l'utilisation de l'acide aminé par le Pénicillium et la successive apparition du même acide aminé qui se détache des ramifications plus intérieures de la molécule de caséine.

Deuxième hypothèse.

La réapparition de quelques acides aminés précédemment disparus peut être causée par des processus métaboliques de la part de Pénicillium avec formation par voie biologique de l'acide aminé disparu; ce que nous supposons avoir lieu au cas de l'apparition d'acides aminés différents de ceux présents dans le lait que nous avons employé.

Résumé.

Ce travail fait partie d'un cycle de recherches effectuées sur l'action de Pénicillium roqueforti dans la maturation des fromages persillés.

Il a été pris en considération les différents acides aminés apparus dans la protéolyse du lait grâce au Pénicillium et sur ces acides aminés il a été étudié au Warburg la courbe d'attaque par la même souche.

D'après le comportement respiratoire nous avons cherché à établir auprès de quels acides aminés le Pénicillium que nous avons considéré possède des enzymes constitutifs ou adaptatifs.

Cette expérience, avec les autres expériences publiées dans d'autres travaux, nous amènent à conclure que probablement l'apparition et la réapparition d'acides aminés dans les protéolysats en lait est due à des processus métaboliques du Pénicillium avec production de nouveaux acides aminés comme métabolytes intermédiaires, ou bien à l'utilisation d'acides aminés de la part du Pénicillium et réapparition des mêmes acides aminés à cause d'une ultérieure démolition de la molécule de la caséine.

Summary.

The work described in this paper is part of a cycle of researches on the action of *Penicillium Roqueforti* during the ripening of Blue cheeses. We have considered the various aminoacids produced by the mould in the proteolysis of milk, and with these amino acids we have determined, using the Warburg apparatus, the attack curve of the particular strain.

Working from the respiratory behaviour, we have tried to

establish a list of the aminoacids with respect to which the *Penicillium* considered has constitutive or adaptive enzymes. These results, together with others published previously, indicate that the appearance and reappearance of the aminoacids in the products of the proteolysis of milk may be due to the metabolic processes of the mould, producing new aminoacids as intermediaries, or else due to utilisation of the acids by the mould, the reappearances being due to further breaking down of the casein molecule.

RÉFÉRENCES

- [1] SALVADORI P., BIANCHI B. et CAVALLI V. Etudes biochimiques de trois souches de *Penicillium Roqueforti*, destinées à la production du fromage Gorgonzola et ayant des activités protéolytiques différentes. *XVI^e Congress Internazionale Laitiere*, 1962, vol. B, pp. 455-463.
- [2] SALVADORI P., BIANCHI B. et CAVALLI V. Differenziazione di alcuni ceppi di *Penicillium* impiegati nella fabbricazione di formaggi erborinati in relazione alle diverse caratteristiche di proteolisi. *Il Latte*, 1, 1962, pp. 18-22.
- [3] FUNDER S. *XIIth Dairy Congress*, 1948, vol. 2, pp. 463-471.
- [4] UMBREIT, BURRIS, STAUFFER. *Manometric Techniques*, 1959. Burgess.

L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE (1)

par C. ALAIS et P. JOLLÈS

Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières, Jouy-en-Josas (2)
et Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris

Deuxième partie (3)

ÉTUDE DES PRODUITS DE LA RÉACTION ET DU SUBSTRAT

RÉSULTATS

1. Proportion du « Caséino-glycopeptide ».

Après l'action de la présure sur la caséine, dans les conditions où la réaction primaire se produit seule (1), le caséino-glycopeptide constitue en moyenne 95 p. 100 des substances azotées non pro-

(1) Extrait de la *Thèse* soutenue par l'un de nous (C. Alais) devant la Faculté des Sciences, Paris, 1962.

(2) Adresse actuelle : Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (S.-et-O.).

(3) Première partie : « Le problème de la réaction spécifique et de son substrat » ; cette revue, septembre-octobre 1963.