

Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin ⁽¹⁾

III. - Son activité protéolytique

par

A. DUCASTELLE (2) et J. LENOIR

Laboratoire de Technologie

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon (78)

INTRODUCTION

Dans deux notes antérieures nous avons étudié la nature de la microflore du fromage de type Saint-Paulin. L'importance relative des groupes microbiens présents et l'évolution de ces groupes au cours de la maturation ont été précisées. A tous les stades de l'affinage les streptocoques lactiques dominent largement, les lactobacilles et les levures restent peu nombreux, les microcoques se multiplient assez activement au cours de la maturation et ils représentent dans le fromage affiné une part appréciable de la flore totale (Ducastelle et Lenoir, 1965 a).

Les espèces dominantes de chacun des groupes dénombrés ont été déterminées. Les bactéries lactiques forment une population relativement homogène. Deux espèces de streptocoques homofermentaires sont présentes, *S. lactis* et *S. diacetylactis*, la première représentant près de 90 p. 100 de la flore lactique. Parmi les lactobacilles, une espèce domine très largement : *L. plantarum*. La population en microcoques est, en revanche, hétérogène ; elle se répartit en huit sous-groupes, le sous-groupe VI des staphylocoques et le sous-groupe 5 des microcoques étant toutefois nettement dominants. Quant aux levures, elles s'apparentent pour la plupart aux genres *Saccharomyces* et *Candida*, chacun de ces groupes représentant près de 50 p. 100 de la population (Ducastelle et Lenoir, 1965 b).

(1) Ce travail, réalisé en 1964, a fait l'objet d'une thèse de troisième cycle de Nutrition (mention Science du lait), présentée à la Faculté des Sciences de Caen en juin 1968.

(2) Adresse actuelle : Laboratoire des Etablissements CLAUDEL, Pont-Hébert (Manche).

Ces résultats tendaient à montrer que, par leur nombre et par certains de leurs caractères, deux groupes de micro-organismes étaient susceptibles de jouer un rôle important dans l'affinage de la pâte, notamment dans la dégradation des protéines ; les streptocoques lactiques, aptes à libérer des enzymes intracellulaires (Van der Zant et Nelson, 1953) et les microcoques dont une proportion appréciable est capable d'hydrolyser la caséine sur milieu gélose au lait (Ducastelle et Lenoir, 1965 b). Afin de préciser la part de ces agents dans la maturation du fromage il convient de déterminer leurs activités respectives et, pour cela, caractériser les enzymes protéolytiques intracellulaires et extracellulaires d'un certain nombre de souches de chacun des groupes microbiens présents.

A. - ACTIVITE PROTEASIQUE INTRACELLULAIRE

Protocole expérimental

1° Choix des souches

Les isoléments ont été effectués, à partir d'une série de six échantillons de fromages ayant atteint des stades de maturation différents, par ensemencement sur milieux sélectifs. Les caractères d'identification des souches isolées ont été déterminés (Ducastelle et Lenoir, 1965 a, 1965 b). Pour chacun des groupes microbiens, quelques souches ont été retenues en vue de l'étude de leurs enzymes protéolytiques : streptocoques lactiques, 6 souches (*S. lactis* : 4 - *S. diacetylactis* : 2) ; lactobacilles, 3 souches (*L. plantarum*) ; microcoques, 9 souches (staphylocoques : 5 - microcoques : 4) ; levures, 2 souches (*Saccharomyces* : 1 - *Candida* : 1).

2° Préparation des extraits enzymatiques

Les souches retenues, en culture de 18 h, sont ensemencées au taux de 2 p. 100 sur un milieu nutritif glucosé à base de caséine A (3). Les streptocoques, les lactobacilles et les levures sont mis à incuber 36 h à 30° C et les cultures sont maintenues au cours de l'incubation à pH compris entre 6 et 7 par additions régulières d'une solution de soude 2 N. Les microcoques sont cultivés en milieu agité, avec une concentration en glucose abaissée à 2 p. 1 000, et une incubation de 2 j à 22° C.

Les cellules microbiennes sont collectées par centrifugation 5 000 tours/mn pendant 20 mn. Les culots sont lavés à deux reprises par dispersion dans une solution tampon phosphate M/15, pH 7, et la pâte de cellules obtenue conservée à 0 - 2° C une nuit.

(3) Formule du milieu A : extrait de levure (Difco) 10 g ; bacto-tryptose (Difco) 10 g ; glucose 15 g ; phosphate bipotassique 7,5 g ; caséine Hammarsten (NBC) 20 g ; eau distillée q.s.p. 1 000 ml ; pH 7.

La désintégration des cellules est réalisée par broyage de 5 g de pâte en suspension dans 10 ml de tampon phosphate M/15, pH 7, à l'aide de l'appareil Mickle selon la technique décrite par Poznanski et al. (1965), en utilisant des billes de verre de 0,11 - 0,12 mm pour les bactéries, de 0,4 mm pour les levures. Le broyat cellulaire est dilué dans 90 ml de solution tampon phosphate M/15 puis le mélange est centrifugé 20 mn à 5 000 tours pour séparer les billes de verre et les débris de cellules.

Les extraits enzymatiques obtenus correspondent à 5 g de cellules dans 100 ml de tampon. Toutefois, pour les microcoques un taux de dilution plus faible, 15 g dans 100 ml, a été adopté.

A partir des résultats des dénombrements effectués sur les milieux de culture la richesse des extraits enzymatiques, exprimée en nombre de cellules par ml, a pu être estimée ; elle atteint en moyenne les valeurs suivantes :

— streptocoques	1,5 - 10 ¹⁰
— lactobacilles	0,8 - 10 ¹⁰
— levures	0,1 - 10 ¹⁰
— microcoques	0,9 - 10 ¹⁰

3° Essais d'activité des extraits enzymatiques

L'activité des extraits est déterminée sur un substrat à base de caséine :

- Caséine Hammarsten (NBC) 25 g ;
- Solution de citrate de sodium 0,02 M q.s.p. 1 000 ml ;
- Le substrat, amené à pH 7,0, est stérilisé, 15 mn à 115° C, et, avant usage, additionné de merthiolate à la dose de 25 µg par ml.

Les mélanges de digestion, sauf indication contraire, présentent la composition suivante :

— substrat caséine	5 ml
— extrait enzymatique	1 ml
— solution tampon, pH 7	1 ml

La solution tampon utilisée, pour fixer le pH à 7, ou pour l'amener à une valeur différente, est un tampon mixte acétate-borate-phosphate 0,25 M, ajusté au pH voulu par addition de soude ou d'acide sulfurique 5 N.

Le mélange de digestion, placé en tubes à essai, est maintenu à température constante pendant le temps choisi, puis déféqué par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 24 p. 100.

Le dosage de l'azote non protéique, libéré par l'action des enzymes, est réalisé par lecture au spectrophotomètre Beckman DU à 274,5 mµ contre le « blanc », filtrat trichloracétique à 12 p. 100 d'un mélange réactionnel non incubé. Les lectures photométriques sont traduites en poids de tyrosine à l'aide d'une courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en µg de tyrosine libérée par ml de filtrat.

Sur chacun des extraits enzymatiques l'influence des facteurs suivants : quantité d'extrait, temps et température d'incubation, pH du mélange de digestion, a été étudiée.

Pour l'étude de l'influence de la quantité d'extrait des volumes de 0,5 - 1 et 2 ml ont été mis en œuvre et le mélange de digestion est complété au volume final de 8 ml par addition de tampon phosphate M/15. En ce qui concerne l'étude des autres facteurs les valeurs limites suivantes ont été retenues : temps, 1 à 6 h ; température, 30 à 60° C ; pH, 4,5 à 8,5. Sauf indications contraires les conditions de digestion, temps et température, sont 5 h et 45° C.

Résultats

1° Streptocoques lactiques

Les résultats des déterminations relatives à l'influence de la quantité d'extrait et du temps de digestion montrent que le degré de protéolyse est lié linéairement au volume de la préparation enzymatique, dans les limites de 0 à 1 ml, et au temps, dans l'intervalle 0 - 6 h. Une prise d'essai de 1 ml et un temps d'action de 5 h ont donc été retenus pour les déterminations de l'activité protéasique.

Sur les six souches essayées, cinq présentent pratiquement le même pouvoir protéolytique (près de 90 µg de tyrosine libérée) ; en revanche, une souche de *S. lactis* (4 S₃) paraît dotée d'une activité beaucoup plus faible, proche de 50 µg (tab. I).

L'étude de l'influence de la température fait cependant apparaître quelques différences (fig. 1). Sur les quatre souches essayées on relève une activité maximale à la température de 45° C mais on peut observer que les activités à 30 et 35° C peuvent présenter d'une souche à l'autre des différences appréciables.

L'influence du pH de mélange de digestion apparaît elle aussi déterminante. Les souches présentent une activité maximale aux valeurs de pH 6,3 - 6,5. Entre pH 6 - 7, les différences d'activité sont faibles, mais aux pH 5,5 - 5,7, pH des pâtes de Saint-Paulin, l'activité protéasique est pratiquement deux fois plus faible qu'au pH optimal (fig. 2). Sur une souche (4 S₃), les essais d'activité en fonction du pH ont été réalisés aux températures de 45 et 35° C. Les allures des deux courbes, sensiblement différentes, pourraient s'expliquer par la présence d'au moins deux systèmes enzymatiques dont les températures et les pH optimaux sont différents, l'un plus actif à pH 7 et à la température de 35° C, l'autre à pH 6,3 et 45° C.

2° Les lactobacilles

Les trois souches de lactobacilles, appartenant à l'espèce *L. Plantarum*, sont dotées de pouvoir protéolytique, mais leurs activités sont assez différentes (tab. I).

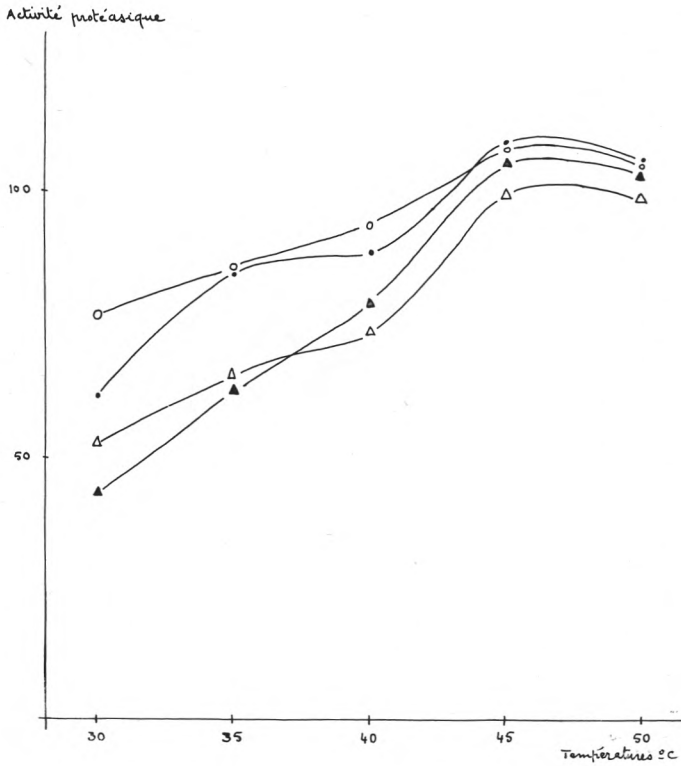


Figure 1

Influence de la température d'incubation sur l'activité des protéases intracellulaires des streptocoques lactiques

En abscisses : température d'incubation en degrés Celsius.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en μg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

- ▲ souche *S. lactis* 3 S₆
- — — 4 S₉
- △ souche *S. diacetylactis* 4 S₁
- — — 4 S₆

Conditions de l'essai : volume d'extrait 1 ml ; temps d'incubation 5 h ; pH du mélange de digestion 7.

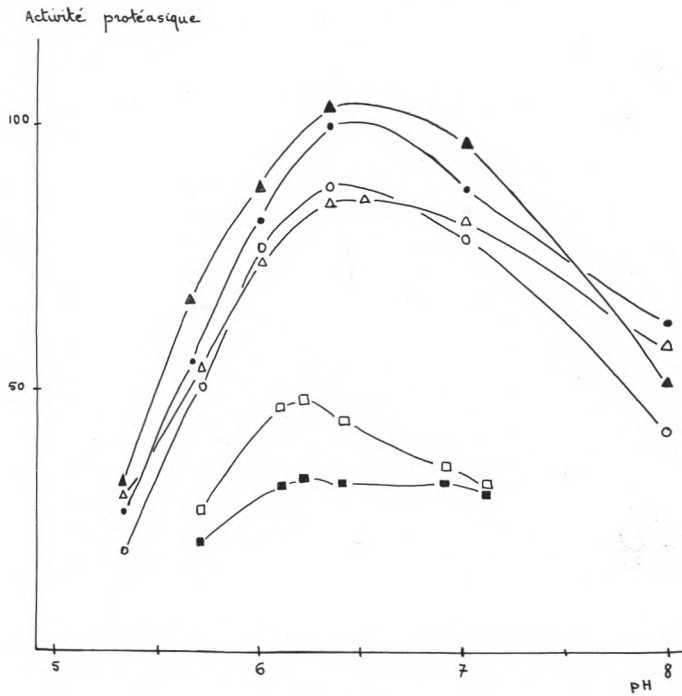


Figure 2

Influence du pH sur l'activité des protéases intracellulaires des streptocoques lactiques

En abscisses : pH du mélange de digestion.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en µg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

- ▲ souche *S. lactis* 3 S₆
- — — 4 S₉
- △ souche *S. diacetylactis* 4 S₁
- — — 4 S₆
- souche *S. lactis* 4 S₃

Conditions de l'essai : volume d'extrait 1 ml ; temps d'incubation 5 h ; température d'incubation 45° C.

- souche *S. lactis* 4 S₃ (température 35° C)

TABLEAU I

Activité protéasique intracellulaire des divers groupes microbiens*
(activité exprimée en μg de tyrosine libérée par ml de filtrat)

Groupes microbiens	Souches	Activité protéasique
Streptocoques	<i>S. lactis</i> 1 S ₃	82
	— 4 S ₃	48
	— 3 S ₆	88
	— 4 S ₉	98
	<i>S. diacetylactis</i> 4 S ₁	89
	— 4 S ₆	82
Lactobacilles	<i>L. plantarum</i> 4 Lb ₂	69
	— 6 Lb ₂	93
	— 3 Lb ₃	59
Microcoques**	Microcoques :	
	sous-groupe 3 2 M ₃	19
	— 5 2 M ₅	11
	— 4 2 M ₅	6
	— 5 2 M ₁₀	10
	Staphylocoques :	
	sous-groupe IV 1 M ₂	9
	— VI 5 M ₃	10
	— VI 6 M ₆	13
	— III 4 M ₇	20
— III 5 M ₈	31	
Levures	<i>Candida</i> 3 L ₃	115
	<i>Saccharomyces</i> 1 L ₅	60

* Conditions des essais : volume d'extrait 1 ml, temps d'incubation 5 h, température d'incubation 45° C, pH du mélange de digestion 7.

** Résultats corrigés et ramenés à une concentration de l'extrait enzymatique correspondant à 5 g de cellules pour 100 ml de tampon ; classement des souches en sous-groupes selon la classification de Baird-Parker (1963).

Les essais relatifs à l'influence de la température et du pH de digestion montrent une activité optimale à 45° C et à pH voisin de 5,5 (fig. 3), c'est-à-dire à une valeur de pH très proche de celle des pâtes de Saint-Paulin en cours de maturation.

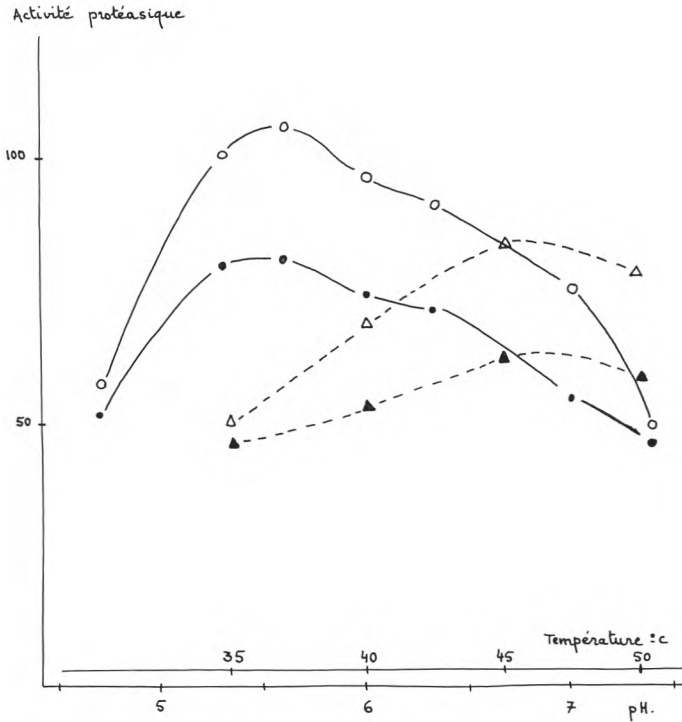


Figure 3

Influence de la température et du pH sur l'activité des protéases intracellulaires de *Lactobacillus plantarum*

En abscisses : températures en degrés Celsius et pH du mélange de digestion.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en µg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

○ et △ : souche 6 Lb₂

● et ▲ : souche 4 Lb₂

Traits pleins : variation d'activité en fonction du pH.

Tirets : variation d'activité en fonction de la température.

Conditions des essais : volume d'extrait 1 ml ; temps d'incubation 5 h ; température d'incubation 45° C (pour les essais pH) ; pH du mélange de digestion 7 (pour les essais de températures).

3° Les microcoques

Sur les neuf souches essayées on observe une activité protéasique intracellulaire relativement faible, sensiblement plus faible que celle des streptocoques ou des lactobacilles et, selon les souches, des différences importantes d'activité sont constatées (tab. I).

L'influence de la température est, dans la plupart des essais, assez peu marquée ; la température optimale est proche de 45° C, sauf pour une souche dont l'optimum se situe à 35° C (fig. 4).

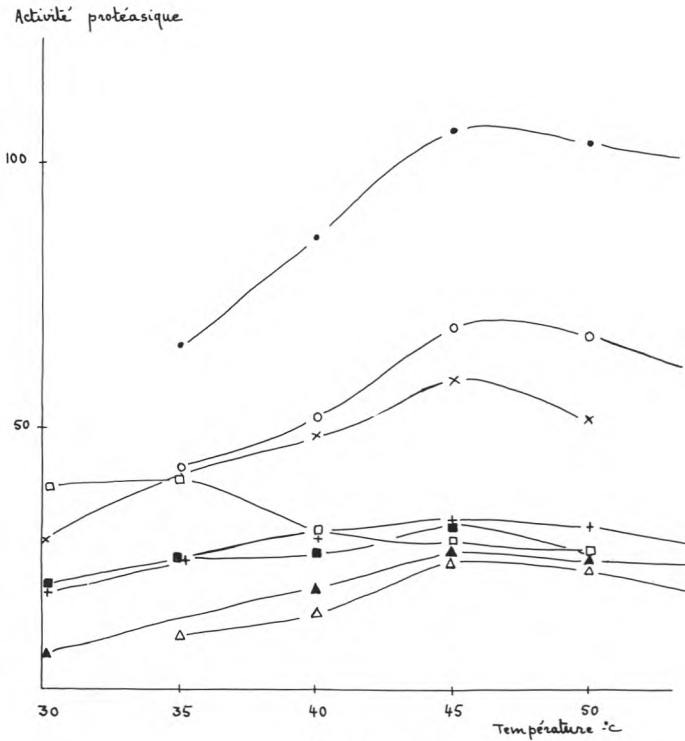


Figure 4

Influence de la température sur l'activité des protéases intracellulaires des microcoques

En abscisses : températures en degrés Celsius.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en μg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

▲ 1 M₂ ; ○ 4 M₇ ; ● 5 M₈ ; △ 5 M₃ ; □ 6 M₆ ; × 2 M₅ ; ■ 2 M₅ ; + 2 M₁₀.

Conditions de l'essai : volume d'extrait 1 ml ; temps d'incubation 5 h ; pH du mélange de digestion 7 (extrait enzymatique correspondant à 15 g de cellules pour 100 ml).

En ce qui concerne l'influence du pH on observe, suivant les souches, des allures de courbes très différentes. La majeure partie des souches présente un pH optimal voisin de 7,5, une souche (4 M₇) a une activité maximale au-dessus de pH 8 ; une autre (5 M₈) présente une activité comparable à pH 6,7 - 7,0 et à pH 8,5 (fig. 5). On peut ainsi remarquer que les différentes souches ont une très faible activité protéasique aux valeurs de pH caractéristiques des pâtes de Saint-Paulin.

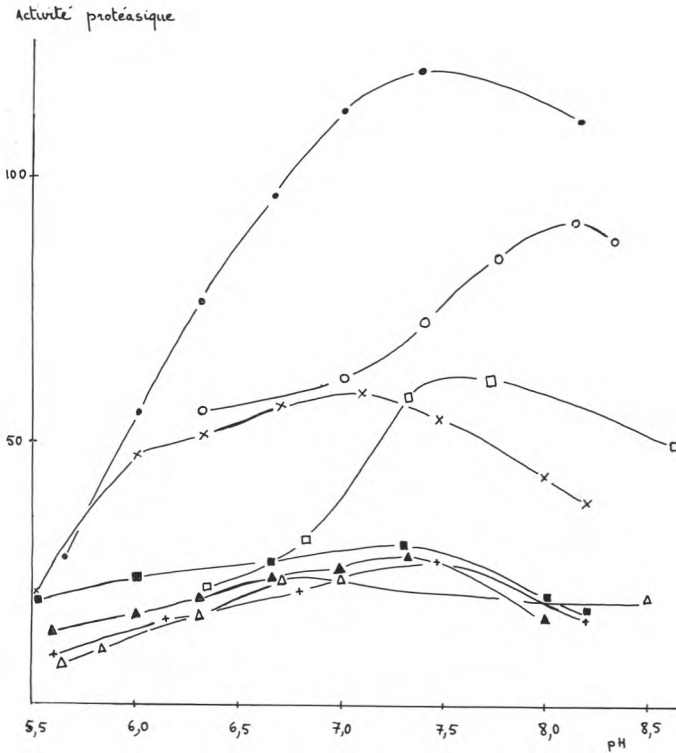


Figure 5

Influence du pH sur l'activité des protéases intracellulaires des microcoques

En abscisses : pH du mélange de digestion.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en μg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

▲ 1 M₂ ; ○ 4 M₇ ; ● 5 M₈ ; △ 5 M₃ ; □ 6 M₆ ; × 2 M₈ ; ■ 2 M₅ ; + 2 M₁₀.

Conditions de l'essai : volume d'extrait 1 ml ; temps d'incubation 5 h ; température d'incubation 45° C (extrait enzymatique correspondant à 15 g de cellules pour 100 ml).

Ces résultats permettent en outre de constater l'existence d'une certaine relation entre l'activité des extraits enzymatiques et le résultat de l'épreuve de digestion de la caséine sur milieu « gélose au lait », les quatre souches (2 M₃, 4 M₇, 5 M₅ et 6 M₆) libérant plus de 50 µg de tyrosine par ml de filtrat à leur pH optimal d'activité digèrent la caséine en milieu gélosé.

4° Les levures

Deux souches ont été essayées, une du genre *Candida* et une du genre *Saccharomyces*. Dans les conditions de l'expérience, l'extrait de la première est près de deux fois plus actif que celui de la seconde (tab. 1).

L'étude de l'influence des facteurs température et pH met en évidence des différences de caractères. Certes, les deux extraits présentent une même température optimale élevée (55° C) et une même sensibilité aux variations de températures ; ainsi à 40° C la libération de tyrosine est deux fois plus faible qu'à 55° C (fig. 6). En revanche, les pH optimaux se situent à des valeurs très différentes, 6,3 pour la souche de *Candida* ; 7,5 pour la souche de *Saccharomyces*. Compte tenu de leur potentiel enzymatique et du fait qu'au pH des pâtes de Saint-Paulin (5,5 - 5,7) leur activité protéasique est proche de la valeur maximale, les levures du genre *Candida* pourraient jouer un rôle non négligeable dans l'affinage du fromage.

B. - ACTIVITE PROTEASIQUE EXTRACELLULAIRE

Cette étude a porté sur un petit nombre de souches et les essais relatifs aux conditions de culture et de détermination de l'activité ont dû être limités. Trois souches de microcoques et deux souches de levures ont été étudiées. Sur les streptocoques lactiques et sur les lactobacilles aucune activité protéasique extracellulaire n'a pu être mise en évidence.

Protocole expérimental

1° Essais préliminaires

Les essais préliminaires ont été réalisés sur des souches de microcoques aptes à digérer la caséine sur milieu gélose au lait. Divers milieux de culture ont été essayés et la méthode préconisée par McDonald (1964) a notamment été éprouvée. Les micro-organismes sont cultivés sur un milieu contenant 0,5 p. 100 de caséine et 0,2 p. 100 d'extrait de levure ajusté à pH 7,0. Le milieu,ensemencé au taux de 2 p. 100, est incubé à la température de 22° C pendant 36 h et constamment agité au cours de l'incubation. La culture est ensuite ajustée à pH 4,6, la caséine et les cellules microbiennes sont séparées par centrifugation et le surnageant neutralisé représente l'extrait enzymatique.

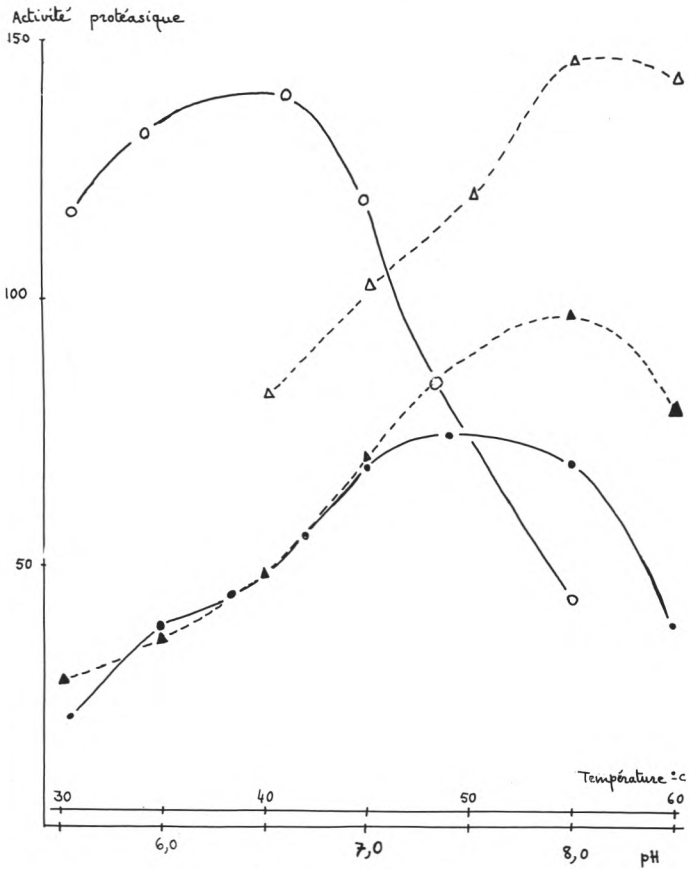


Figure 6

Influence de la température et du pH sur l'activité des protéases intracellulaires des levures

En abscisses : températures en degrés Celsius et pH du mélange de digestion.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en µg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

○ et △ souche *Candida* 3 L₃

● et ▲ souche *Saccharomyces* 1 L₅

Traits pleins : variations d'activité en fonction du pH.

Tirets : variations d'activité en fonction de la température.

Conditions des essais : volume d'extrait 1 ml, temps d'incubation 5 h, température d'incubation 45° C (pour les essais pH), pH du mélange de digestion 7 (pour les essais températures).

L'activité de l'extrait est déterminée selon la technique utilisée pour l'étude des enzymes intracellulaires.

Dans ces conditions, les souches ne libèrent dans le milieu de culture que des quantités très faibles de protéases.

Une autre méthode d'estimation de l'activité protéasique exocellulaire a été essayée.

Le micro-organisme (souche 4 M₇) est cultivé 36 h à 22° C sur le milieu nutritif A. Les cellules sont collectées par centrifugation, lavées trois fois avec une solution de Ringer au 1/4 et mises en suspension à raison de 1 g de pâte pour 10 ml de Ringer.

L'activité protéasique de la suspension est déterminée selon la technique précédemment exposée. Le mélange de digestion a la composition suivante :

— substrat caséine	5 ml
— suspension de cellules	0,5 ou 1 ml
— solution de Ringer au 1/4	1,5 ou 1 ml
— tampon pH 7	1 ml

Un mélange témoin (citrate de sodium 0,02 M, 5 ml ; suspension de cellules, 0,5 ou 1 ml ; Ringer au 1/4, 1,5 ou 1 ml, tampon pH 7, 1 ml) est incubé dans les mêmes conditions que le mélange de digestion, soit 5 h à 30° C.

Sur les filtrats trichloracétiques à 12 p. 100 des deux mélanges on détermine la teneur en composés azotés solubles par lectures spectrophotométriques à 274,5 m μ contre les blancs correspondants, c'est-à-dire les filtrats trichloracétiques des mélanges non incubés. Les résultats des lectures, exprimés en densités optiques, sont les suivants :

Volume de la suspension en ml	D.O. mélanges témoins	D.O. mélanges de digestion	D.O. différence	Activité protéasique*
0,5	0,36	0,76	0,40	52
1	0,72	1,55	0,83	106

* Activité exprimée en μ g de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

Dans ces conditions opératoires la protéolyse du substrat, donc l'excrétion d'enzymes, paraissent appréciables. Nous ne les avons cependant pas retenues en raison de la forte excrétion d'azote non protéique qui se produit au cours de la digestion.

Une technique proche, mais séparant les deux phénomènes excrétion et protéolyse, a été jugée préférable.

2° Conditions opératoires

Les cellules microbiennes, cultivées sur milieu nutritif A 36 h à 22° C, sont collectées par centrifugation, lavées à trois reprises avec un tampon phosphate M/15 pH 7 et mises en suspension dans ce tampon à raison de 1 g de cellules pour 10 ml.

La suspension est conservée 12 h à la température de 20 - 22° C puis les cellules sont séparées par centrifugation, 20 mn à 5 000 t/mn. Le surnageant, qui contient les enzymes et l'azote non protéique excrétés par les cellules, représente l'extrait enzymatique. Son activité est déterminée selon la technique mise en œuvre pour les enzymes intracellulaires.

Résultats

1° Microcoques

Sur les trois souches essayées, une seule, 4 M_r appartenant au sous-groupe III des staphylocoques, s'est révélée présenter une activité protéasique exocellulaire notable dans les conditions expérimentales retenues.

L'étude des facteurs, quantité d'enzymes et temps de digestion, a montré que le degré de protéolyse est lié linéairement au volume d'extrait, dans les limites 0 - 1 ml, et au temps, dans l'intervalle 0 - 5 h.

L'activité protéasique est maximale aux températures de 45 - 50° C et à pH voisin de 7,2. Pour les valeurs de pH inférieures à 7 on observe une diminution sensible de l'activité et au pH du fromage, 5,5 - 5,7, celle-ci est trois à quatre fois plus faible qu'au pH optimal (fig. 7).

On peut remarquer que l'activité protéasique intracellulaire de cette souche était maximale à un pH nettement plus élevé, 8,2 ; il s'agit donc probablement d'enzymes différents.

2° Levures

Les deux souches de levures (3 L_s et 1 L_s) excrètent des enzymes dans les conditions de l'expérience, mais l'activité protéasique ainsi libérée est sensiblement plus faible que celles de la souche de microcoques (fig. 7). Contrairement à ce qui a été observé avec les enzymes intracellulaires, la souche *Saccharomyces* apparaît plus active, à pH 7 et à 45° C, que la souche *Candida*.

L'influence du facteur pH est intéressante à observer. L'activité de la levure *Candida* est maximale à un pH proche de 6, la souche *Saccharomyces* présente un pH optimal compris entre 7,5 et 8 (fig. 7). Ainsi, on constate, sur l'une et l'autre souche, que les protéases intra et exocellulaires présentent leur activité maximale aux mêmes valeurs de pH. Il est donc possible que ces levures ne possèdent qu'un seul système enzymatique, système qui serait susceptible d'être excrété dans les milieux de culture.

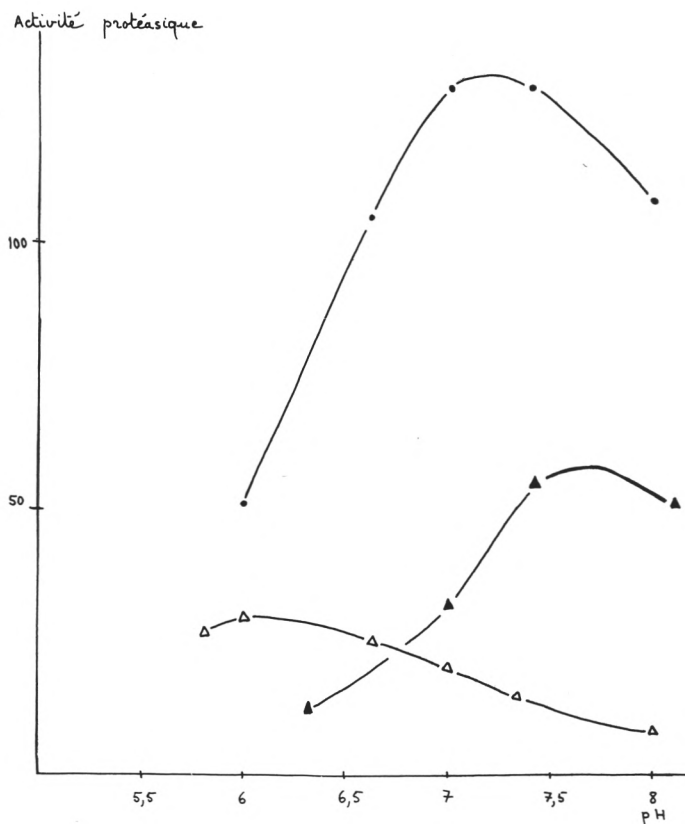


Figure 7

Influence du pH sur l'activité des protéases exocellulaires

En abscisses : pH du mélange de digestion.

En ordonnées : activité protéasique exprimée en μg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

● souche de microcoque 4 M₇

△ souche de *Candida* 3 L₃

▲ souche de *Saccharomyces* 1 L₅

Conditions des essais : volume d'extrait 1 ml ; temps d'incubation 5 h ; température 45° C.

C. - DISCUSSION

Parmi les micro-organismes qui peuplent les pâtes du Saint-Paulin les streptocoques lactiques, notamment *S. lactis*, constituent le groupe largement dominant. Ces germes ne possèdent sans doute pas une aptitude à la protéolyse particulièrement marquée. La production de protéases extracellulaires par ces espèces n'a été que rarement signalée (Williamson et al., 1964) et nous n'avons pu la mettre en évidence sur aucune des souches étudiées. Mais, même si elle est faible, ou si elle ne concerne qu'un petit nombre de souches, l'excrétion d'enzymes pourrait être non négligeable, particulièrement dans les caillés et les fromages jeunes, en raison de la présence d'un très grand nombre de cellules vivantes. Il apparaît cependant évident que ce groupe de micro-organismes doit surtout agir par ses protéases intracellulaires (Baribo et Foster, 1952 ; Van der Zant et Nelson, 1953) ; la lyse des cellules au cours de la maturation est, nous l'avons noté, massive (Ducastelle et Lenoir, 1965 a) et les enzymes protéolytiques ainsi libérées sont actives au pH du fromage.

La présence des lactobacilles n'a certainement pas la même importance au regard du phénomène de protéolyse. L'espèce dominante, *L. plantarum*, ne semble pas produire d'exoenzymes ; quant à l'activité des protéases intracellulaires, elle est notable et même maximale au pH du fromage, mais le nombre des cellules paraît trop faible pour que l'action de ces enzymes puisse être appréciable.

L'influence des microcoques sur la dégradation des protéines devrait être plus réelle. Plusieurs espèces de ce groupe sont protéolytiques et leur intervention dans la maturation et le développement de l'arôme des fromages a été maintes fois signalée (Alford et Frazier, 1950 ; Baribo et Foster, 1952 ; Jacquet et Steeg L., 1953 ; Robertson et Perry, 1961 ; Mc Donald, 1964). Au sein des pâtes de Saint-Paulin, ces micro-organismes sont présents et ils se multiplient au cours de l'affinage (Ducastelle et Lenoir, 1965 a). Sont-ils pour autant en mesure d'exercer une action importante sur la dégradation des matières azotées de ce type de fromage ?

Les essais réalisés montrent que les souches possèdent des protéases intracellulaires mais l'activité de celles-ci paraît trop faible au pH du fromage pour qu'elles puissent être considérées comme très influentes. L'intervention des microcoques par action de protéases extracellulaires semble plus probable si l'on se réfère au nombre de souches aptes à digérer la caséine sur milieu gélose au lait (Ducastelle et Lenoir, 1965 b). Certes, dans nos essais, l'excrétion d'enzymes par des souches apparemment protéolytiques est-elle souvent faible et même parfois nulle ; mais cette observation n'est pas nécessairement incompatible avec l'aptitude des micro-organismes à agir sur le substrat environnant. Les germes peuvent en effet posséder des enzymes qui sont réparties à l'extérieur de la membrane

cytoplasmique et qui, cependant, restent liées à la cellule (Pollock, 1962) ; ces enzymes « de surface » pourraient être responsables du pouvoir protéolytique (Mc Donal, 1964). Ainsi, il a été observé chez plusieurs souches de *M. caseolyticus* que l'excrétion d'enzymes dans le milieu de culture, ou en solution saline de faible concentration, pouvait être nulle et l'activité protéasique intracellulaire très faible, les protéases restant liées aux débris de cellules et se retrouvant dans le broyat cellulaire total ou dans la suspension des fragments du broyat séparés par centrifugation (Lenoir et Auberger). Il a d'ailleurs été montré que les protéases exocellulaires chez *M. freudenreichii* (Mc Donald, 1962) et chez *M. caseolyticus* (Desmazeaud et Hermier, 1968 a) avaient tendance à rester fixées à la paroi cellulaire et qu'elles pouvaient en être libérées par l'action des sels à des concentrations relativement élevées.

Les résultats obtenus dans les conditions de nos essais ne permettent donc pas de préciser l'aptitude des microcoques à la production de protéases exocellulaires. Il semble cependant que cette production est très limitée, sinon nulle, aux pH inférieurs à 6 (Desmazeaud et Hermier, 1968 a) ; quant à l'activité des enzymes extracellulaires éventuellement produites, aux pH des pâtes 5,5 - 5,7, elle apparaît faible (Desmazeaud et Hermier, 1968 b ; Lenoir et Auberger). Il est donc peu probable que les microcoques puissent intervenir très efficacement au cours de la maturation du Saint-Paulin par action de leurs protéases extracellulaires.

Les levures représentent, au sein de la microflore, une population relativement peu nombreuse. Elles possèdent cependant des protéases et on constate que les extraits intracellulaires des levures du genre *Candida* sont les systèmes protéolytiques les plus actifs au pH des pâtes.

Peut-on, à partir de ces résultats, établir un bilan et préciser l'action respective de chacun des groupes microbiens présents dans la dégradation des matières azotées du fromage de Saint-Paulin ?

Le diagramme de la figure 8 permet de comparer l'activité des protéases intracellulaires des différentes souches au pH du fromage (5,7). Il convient cependant de rapporter le pouvoir protéolytique à un même nombre de cellules pour pouvoir confronter les résultats à l'importance numérique des populations. Sur la base des données du diagramme (fig. 8) et des résultats des dénombrements effectués lors de la préparation des extraits enzymatiques le pouvoir protéasique intracellulaire des diverses souches se traduit par les coefficients relatifs mentionnés dans le tableau II.

On voit ainsi que la levure *Candida* apparaît dotée d'une activité sensiblement égale à 10 fois celles des lactobacilles, 20 - 25 fois celles des streptocoques, 30 - 50 fois celles des microcoques. En tenant compte de l'importance respective des populations au sein de la microflore on peut alors attribuer aux groupes microbiens les coeffi-

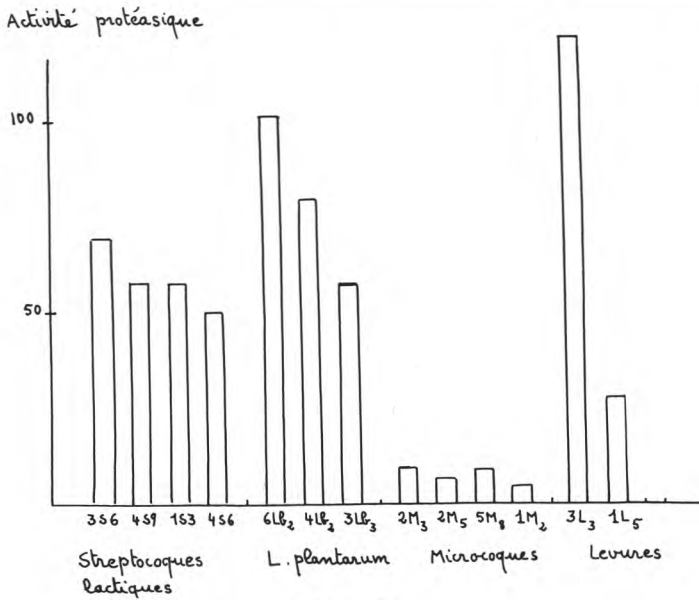


Figure 8

Activité protéasique intracellulaire des diverses souches
à pH 5,7

Activité protéasique exprimée en µg de tyrosine libérée par ml de filtrat trichloracétique.

Conditions des essais : richesse de l'extrait 5 g pour 100 ml, volume d'extrait 1 ml, temps d'incubation 5 h, température 45° C.

cients approximatifs suivants pour leur action protéolytique au cours de l'affinage : streptocoques lactiques de l'ordre de 1 000, microcoques et levures de l'ordre de 1, lactobacilles de l'ordre de 0,1.

Une telle estimation ne peut évidemment pas être considérée comme une image réelle de la participation des groupes microbiens à la dégradation des protéines du caillé.

On remarquera que les microcoques, qui se développent au cours de l'affinage, peuvent libérer des enzymes extracellulaires dont l'action, probablement limitée dans ce type de fromage, est difficile à apprécier. De même, certaines souches de levures apparaissent très actives, mais, selon les fabrications, elles peuvent être présentes en nombres extrêmement variables (Ducastelle et Lenoir, 1965 a). Notons aussi que l'importance réelle du stock microbien apte à libérer des enzymes intracellulaires au cours de la maturation ne peut être estimée que très approximativement.

TABLEAU II

Activités protéasiques intracellulaires comparées à pH 5,7
et pour un même nombre de cellules

Groupes microbiens	Souches	Activité relative
Levures	<i>Candida</i> 3 L ₃	100
	<i>Saccharomyces</i> 1 L ₅	23
Lactobacilles	<i>L. plantarum</i> 6 Lb ₂	13,6
	— 4 Lb ₂	10,5
	— 3 Lb ₃	7,6
Streptocoques	<i>S. lactis</i> 3 S ₆	5,0
	— 4 S ₉	4,1
	— 1 S ₃	4,1
	<i>S. diacetylactis</i> 4 S ₆	3,4
Microcoques	<i>Micrococcus</i> 2 M ₃	3,3
	— 2 M ₅	2,3
	<i>Staphylococcus</i> 5 M ₈	3,3
	— 1 M ₂	1,6

On sait, par ailleurs, que de nombreux facteurs peuvent modifier l'aptitude des micro-organismes à la production d'enzymes ou l'activité de celles-ci (Davies, 1963). Les résultats obtenus à partir de souches pures, sur des préparations enzymatiques brutes, et dans des conditions opératoires fort différentes des conditions de l'affinage, ne peuvent avoir qu'une valeur indicatrice ; leur transposition directe au niveau des fromages en cours de maturation serait donc quelque peu hasardeuse.

Il n'en reste pas moins que, par son importance numérique et son potentiel protéasique intracellulaire, le groupe des streptocoques lactiques paraît bien être, comme l'ont déjà observé Marceron et al. (1966), l'agent microbien susceptible de jouer un rôle déterminant dans la dégradation des matières azotées des fromages de type Saint-Paulin.

Remerciements

Nous remercions M. Hermier qui a bien voulu mettre à notre disposition le « désintégreur » Mickle.

(Reçu pour publication en juin 1969).

Résumé

Sur un certain nombre de souches de streptocoques lactiques (*S. lactis* et *S. diacetylactis*), de lactobacilles (*L. plantarum*), de microcoques (staphylocoques et microcoques), et de levures (*Saccharomyces* et *Candida*) isolées de fromages de Saint-Paulin en voie de maturation, l'activité des protéases intracellulaires a été déterminée sur un substrat à base de caséine. Le système enzymatique de chaque espèce a été caractérisé par son pH optimal et sa température optimale d'action ; les valeurs trouvées sont respectivement 6,3 et 45° C pour les streptocoques lactiques, 5,5 et 45° C pour les lactobacilles, 7,5 et 45° C pour les microcoques, 6,3 et 55° C pour *Candida*, 7,5 et 55° C pour *Saccharomyces*.

Aucune activité protéasique extracellulaire n'a été décelée sur les souches de streptocoques ou de lactobacilles. En revanche, une souche de microcoque s'est révélée dotée d'un potentiel protéasique extracellulaire appréciable. L'activité de ces enzymes est maximale à pH 7,2 et à la température de 45° C.

Les levures, notamment celles du genre *Saccharomyces*, excrètent également des protéases. Leurs caractères sont très proches de ceux des systèmes intracellulaires et il est possible qu'il s'agisse des mêmes enzymes.

L'activité protéasique intracellulaire des divers groupes microbiens, au pH des pâtes, permet d'estimer le rôle respectif de ces groupes dans l'affinage des fromages. En tenant compte de l'importance numérique des populations, le groupe des streptocoques apparaît responsable de l'action protéolytique la plus grande. Elle serait environ 1 000 fois plus forte que celle attribuée aux microcoques et aux levures, près de 10 000 fois plus élevée que celle exercée par les lactobacilles.

Bien que l'action des protéases extracellulaires des microcoques n'ait pu être appréciée exactement, elle paraît, dans ce type de pâte, assez limitée. Finalement il semble bien que l'on puisse attribuer au groupe des streptocoques lactiques la part essentielle dans la dégradation des protéines du fromage de Saint-Paulin.

Summary

The activity of intracellular proteases has been determined on a certain number of lactic streptococci, lactobacilli (*L. plantarum*), micrococci and yeasts (*Saccharomyces* and *Candida*). Those strains have been isolated from Saint-Paulin cheese, in process of ripening.

The used substrat is constituted by casein product. The enzymatic system of each specie has been characterized by its optimal pH and its optimal temperature of action : the discovered values are 6,3 and 45° C for lactic streptococci, 5,5 and 45° C for lactobacilli, 7,5 and

45° C for micrococci, 6,3 and 55° C for *Candida*, 7,5 and 55° C for *Saccharomyces*.

No extracellular proteasic activity has been discovered on the streptococci or lactobacilli strains. On the other hand, a perceptible extracellular proteasic potentiel has been tested on a micrococcus strain. The activity of these enzymes is optimal at pH 7,2 and at a temperature of 45° C.

The yeast, especially these of *Saccharomyces* genus, excretes proteases too. Their characteristics are very close to the ones of the intracellular systems and they are probably the same enzymes.

The intracellular protease activity of the various microbial groups taken at the pH of the curd let appreciate the part of each one of these groups in the cheeses ripening. By considering the numeric importance of the populations, the streptococci group looks to be responsible of the highest proteolytic action. It would be about one thousand time stronger than those attributed to micrococci and yeasts, nearly ten thousand time higher than those exercised by lactobacilli.

Though the action of extracellular proteases of the micrococci has not been exactly appreciated, it looks to be, in this type of cheese, weak. Finally, it appears as nearly sure, that the essential part in the protein degradation of Saint-Paulin cheese may be attributed to the streptococci group.

Références bibliographiques

- [1] ALFORD (J. A.), FRAZIER (W. C.). — Effect of micrococci on the development of flavour when added to Cheddar cheese made from pasteurized milk. *J. Dairy Sci*, 1950, 33, 115-120.
- [2] BAIRD-PARKER (A. C.). A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 1963, 30, 409-427.
- [3] BARIBO (L. E.), FOSTER (E. M.). — The intracellular proteinases of certain microorganisms from cheese and their relationships to the proteinases in cheese. *J. Dairy Sci.*, 1952, 35, 149-160.
- [4] DAVIES (R.). — Microbial extracellular enzymes, their uses and some factors affecting their formation. In RAINBOW (C.), ROSE (A. H.), *Biochemistry of industrial Microorganisms*, 68-150, Academic Press, New-York, 1963.
- [5] DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.). — Facteurs intervenant dans la production du système protéolytique chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol., anim. Bioch. Biophys.*, 1968 a, 8, 419-429.
- [6] DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.). — Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1968 b, 8, 565-577.
- [7] DUCASTELLE (A.), LENOIR (J.). — Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. I. Son évolution au cours de la maturation. *Le Lait*, 1965 a, 447, 371-378.
- [8] DUCASTELLE (A.), LENOIR (J.). — Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. II. Ses espèces dominantes. *Le Lait*, 1965 b, 448, 509-518.

- [9] JACQUET (J.), STEEG (L.). — Les microcoques de la flore superficielle des fromages à pâte molle. *C.R. Ac. Sci.*, 1953, 237, 767-768.
- [10] LENOIR (J.), AUBERGER (B.). — Données non publiées.
- [11] MARCERON (J. F.), LENOIR (J.), VEISSEYRE (R.). — Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin et de son activité protéolytique. *C.R. XVII^e Cong. Int. Lait.*, 1966, vol. D., 603-610.
- [12] Mc DONALD (I. J.). — Location of proteinase in cells of a species of *Micrococcus*. *Can. J. Microbiol.*, 1962, 8, 785-794.
- [13] Mc DONALD (I. J.). — Characteristics of proteinases of 3 strains of *Staphylococcus lactis* isolated from Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 1964, 31, 149-153.
- [14] POLLOCK (M. R.). — *Exoenzymes*. In GUNSALUS (J. C.) and STANIER (R. Y.), *The Bacteria*, vol. 4, 121-178, *Academic Press*, New-York, 1962.
- [15] POZNANSKI (S.), LENOIR (J.), MOCQUOT (G.). — La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Le Lait*, 1965, 441-442, 3-26.
- [16] ROBERTSON (P. S.), PERRY (K. D.). — Enhancement of the flavour of Cheddar cheese by adding a strain of micrococcus to the milk. *J. Dairy Res.*, 1961, 28, 245.
- [17] VAN DER ZANT (W. C.), NELSON (F. E.). — Characteristics of an endocellular proteolytic enzyme system of *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 1953, 36, 1 212-1 222.
- [18] WILLIAMSON (W. T.), TOVE (S. B.), SPECK (M. L.). — Extracellular proteinase of *Streptococcus lactis*. *J. Bact.*, 1964, 87, 49.
-