

Activité protéolytique de quelques micro-organismes responsables de la maturation des fromages persillés

par

Giuliano LUSIANI, Bruna BIANCHI-SALVADORI
et Pietro SALVADORI

Centro Sperimentale del Latte, Milano
Directeur Professeur P. SALVADORI

Introduction

Le fromage Gorgonzola, comme les persillés en général, est produit, selon la technologie moderne, avec l'emploi de levains microbiens constitués de ferments lactiques sélectionnés et de moisissures appartenant au genre *Penicillium*. Ces micro-organismes contribuent à l'affinage du fromage par la flore microbienne présente à la fois dans le lait, dans l'équipement et dans les locaux d'affinage.

Il s'agit donc d'une flore hétérogène, dont le pouvoir protéolytique varie selon l'espèce. Il est connu que les protéolyses les plus marquées se font remarquer là où les moisissures se sont développées plus abondamment et où se trouvent aussi de nombreuses levures. Toutefois on ne doit pas négliger la protéolyse opérée par quelques ferments lactiques, prise en considération par des auteurs divers [1-2-3-4].

D'autre part l'affinage de quelques espèces de fromages se déroule sans l'intervention d'agents protéolytiques violents comme les moisissures ou levures, mais exclusivement par moyen de schizomycètes et pour une petite part avec l'aide des enzymes de la présure [5].

Toutefois, pas toute la flore lactique protéolysante n'est agréable pendant les phases d'affinage ; dans notre travail précédent [6] nous avons en effet remarqué que quelques genres de streptocoques attribuables à l'espèce *faecalis* produisaient une substance amère, ce qui cause la dépréciation du fromage.

But de la recherche

Ce travail se rattache à nos études précédentes [7-8-9-10] où nous avons étudié les produits de dégradation des protéines et des gras-

ses de la part de *Penicillium roqueforti* que nous considérons logiquement comme le responsable de l'affinage du fromage. A côté de cette recherche nous nous sommes proposés le but d'étudier les caractéristiques de la protéolyse des lactiques (ajoutés ou non) que nous trouvons pendant les phases technologiques du Gorgonzola.

Avant tout nous avons fait un travail préliminaire pour individualiser quelles espèces de lactiques se trouvent en général dans le lait destiné à la fabrication de Gorgonzola. Dans le but de simplifier en partie notre travail, nous avons pris en considération la seule technologie qui prévoit l'emploi de lait pasteurisé.

D'après ces sondages nous avons pu établir que outre, des levains, les lactiques proviennent aussi du lait bien qu'il soit pasteurisé, de la poudre de lait qu'on emploie ordinairement pour la préparation des levains, des récipients, de l'outillage et des locaux d'égouttage (chambre chaude où l'égouttage du caillé continue pendant quelques jours).

En outre il faut rappeler que les levains, qui dans ce cas sont représentés par association de thermophiles, sont habituellement enrichis avec 5-10 p. 100 de flore mésophile.

Les espèces que nous avons étudiées dans le but d'établir le pouvoir protéolytique par la formation des acides aminés, sont les suivantes : *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetilactis*, *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus*. Les deux souches de *Str. faecalis* sont les mêmes qui ont provoqué des phénomènes de goût amer dans le fromage Gorgonzola.

Méthodes

Les lactiques isolés du lait et fromage ont été identifiés selon les méthodes biochimiques usuelles ; pour les streptocoques des groupes N et D de Lancefield on a effectué une ultérieure identification sérologique.

Le lait destiné à l'inoculation des ferments était préparé en partant de poudre de lait écrémé sûrement sans substances antibiotiques et antifermentatives, et dissout dans l'eau distillée à raison de 10 p. 100. Avant l'emploi la poudre de lait était libérée d'éventuelles traces de graisse par extraction avec de l'éther éthylique. Le lait reconstitué était mis dans des erlenmeyers à raison de 400 cm³ chacun, suivi par une stérilisation à 115° C pendant 20 mn ; ensuite on ajoutait du chlorure sodique stérile à raison de 1 p. 100.

Au moment de l'inoculation on réchauffait le lait à 34° C en le maintenant à cette température environ 1 h après l'inoculation. Ensuite l'inoculation continuait pour 4 j à 22° C et à la fin à 4° C pour 27 j. Parallèlement deux erlenmeyers de lait témoin pas inoculés suivaient le même traitement. De cette manière on a cher-

Résultats

Après 4 j d'incubation à 22° C les cultures montraient les caractéristiques suivantes :

<i>L. bulgaricus</i>	Aucune coagulation
<i>Str. thermophilus</i>	Aucune coagulation
<i>Str. lactis</i>	Coagulation très faible.
<i>Str. cremoris</i>	Aucune coagulation.
<i>Str. diacetylactis</i>	Coagulation très faible.
<i>Str. faecalis</i>	Coagulation compacte.
<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	Coagulation compacte avec protéolyse légère.
Contrôle témoin	Aucune coagulation.

Après 31 j d'incubation à + 5° C les cultures montraient les caractéristiques suivantes :

	Aspect de la culture	Acidité	pH	Morphologie
<i>L. bulgaricus</i>	Coagulation faible avec protéolyse légère.	0,50	5,20	Bâtonnets longs et peu abondants.
<i>Str. thermophilus</i>	Coagulation faible avec dépôt sur le fond.	0,80	4,25	Chaînettes très longues avec des coques très ovalaires.
<i>Str. lactis</i>	Coagulation faible et laiteuse	0,95	3,90	Coques abondants.
<i>Str. cremoris</i>	Coagulation légère sur le fond.	0,92	4,10	Coques abondants.
<i>Str. diacetylactis</i>	Coagulation sur le fond.	0,90	4,15	Coques peu abondants.
<i>Str. faecalis</i>	Coagulation compacte et gélatineuse. Protéolyse partielle.	1,00	4,20	Coques abondants.
<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	Protéolyse complète.	0,60	5,65	Coques abondants.
Contrôle témoin	Aucune coagulation.	0,27	6,07	—

ché à maintenir les lactiques aux températures qu'ils auraient rencontrées dans les phases technologiques du fromage, avec la seule variation qu'on a arrêté l'essai à 1 mois au lieu de 2 (temps nécessaire pour terminer l'affinage du Gorgonzola). Cet arrêt trouve une raison valable dans le fait qu'après 1 mois l'affinage du Gorgonzola se produit surtout par l'action des *Penicillium* et en partie aussi des levures. A la fin des 31 j on a déterminé le pH et l'acidité des cultures ; en outre on a effectué l'évaluation macroscopique du caillé et l'observation microscopique des cultures. Ensuite on a déterminé pour chaque culture la quantité des acides aminés libres produits, en utilisant la méthode décrite par Moore et *al.* [11-12] avec un analyseur automatique Beckmann 120 B. Pour les acides aminés basiques on a utilisé la colonne courte et pour ceux acides ou neutres la colonne longue.

Tous les essais ont été exécutés en double et les données des tableaux reflètent donc la moyenne des deux résultats.

Le tableau 1 montre les données relatives à la détermination quantitative des acides aminés présents dans les cultures à la fin de l'incubation.

Conclusions

Il paraît évident que les streptocoques du groupe D déploient une protéolyse plutôt accentuée à température basse et cela nous autorise donc à supposer que leur action a une influence considérable sur l'affinage du Gorgonzola quand ces micro-organismes sont présents en grand nombre. Ce fait n'est absolument pas rare, car dans un de nos travaux précédents nous avons trouvé de fortes charges de streptocoques fécaux dans des fromages mûrs, qui dans la plupart des cas avaient un goût amer.

En général on peut constater que la production d'acides aminés libres est plus élevée pour le *L. bulgaricus* et pour les streptocoques fécaux. Toutefois, dans toutes les espèces étudiées on a trouvé une production de proline, sérine, asparagine + glutamine, isoleucine et phénylalanine. La méthionine libre n'a été trouvée que dans les cultures de *L. bulgaricus* et des streptocoques fécaux, la cystine que dans la culture *Str. faecalis* var. *liquefaciens*.

Nous pouvons donc conclure que les schizomicètes dans l'affinage du Gorgonzola déploient, à notre avis, une action acidifiante et protéolytante. Cette thèse est appuyée par la pratique où l'on voit une diminution du pH dans les premières phases de l'affinage. Néanmoins, l'augmentation et l'évolution des acides aminés ainsi que la conséquente protéolyse légère font supposer que ces produits sont utilisés successivement par la flore microbienne constituée pour la plupart des moisissures et levures responsables d'une forte action protéolytique et lipolytique.

TABLEAU 1

Mg des acides aminés/100 g du lait	<i>L. bulgaricus</i>	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Str. lactis</i>	<i>Str. cremoris</i>	<i>Str. diacetylactis</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	Contrôle témoin
Acide aspartique	1,099		0,305		0,071	0,130	0,990	0,221
Thréonine	0,540	0,628	0,066	0,550	0,111	0,570	1,666	0,077
Sérine	2,504	0,139	0,133	0,115	0,317	0,295	0,743	0,066
Asparagine + Glutamine	0,410	0,304	0,399	0,430	0,522	0,256	0,511	0,032
Sarcosine		0,157	0,186	0,067	+	+		+
Proline	4,504	1,252	0,979	1,274	1,040	1,335	+	0,217
Acide glutamique	7,514	0,492	2,687	2,305	3,376	1,185	0,548	5,171
Glycine	2,663	0,139	0,024	0,082	0,058	1,023	0,857	0,754
Alanine	1,094	3,911	1,272	4,130	1,205	3,658	2,302	0,260
Valine	3,840	+	0,013	0,009	0,013	3,333	2,148	0,112
Cystine							4,113	
Méthionine	0,899					0,768	1,488	+
Isoleucine	1,843	0,184	0,143	0,239		0,921	2,505	0,056
Leucine	5,708	0,007	0,007	0,011	0,100	6,055	11,297	0,058
Tyrosine	2,560	0,138	0,104	0,158	0,029	0,051	5,402	0,070
Phénylalanine	2,079	0,333	0,344	0,465	0,319	3,493	2,041	0,043
A. α aminobutyrique	0,030							
A. γ aminobutyrique	0,042	0,161	0,874	0,314	0,074	10,347	+	0,041
Ornithine	0,056	0,023	0,051	0,025	0,043	0,039	4,883	0,044
Ethanolamine		0,177	0,247	0,122	0,250	0,087		0,305
Lysine	3,135	0,031	0,056	0,056	0,069	0,518	0,524	0,181
Histidine	0,640	0,012	0,064	0,044	0,021	0,282	0,882	0,039
Tryptophane	1,178							
Arginine	1,754	0,014	0,015	0,012	0,041	0,264	0,387	0,692

Il nous faut toutefois maintenir une seule réserve qui concerne quelques souches de *Streptococcus faecalis*, où les caractéristiques protéolytiques sont macroscopiquement identiques à celles du *Penicillium*. Nous nous réservons donc de contrôler dans un prochain travail si les produits de dégradation de la caséine dûs au *Streptococcus faecalis* sont similaires à ceux dûs au *Penicillium*.

Résumé

On a pris en considération les caractéristiques protéolytiques de quelques souches de ferments lactiques qu'on trouve ordinairement dans les fromages persillés.

Quelques souches de *Str. faecalis* se sont montrées particulièrement protéolytiques en attaquant le lait à peu près comme le *Penicillium roqueforti*. Par conséquent les auteurs se proposent d'étudier, dans un prochain travail, si les produits de dégradation de la caséine dûs aux streptocoques fécaux sont similaires à ceux dûs au *Penicillium*.

Summary

The authors have taken into consideration the proteolytic properties of some strains of lactic acid bacteria which are ordinarily found in blue cheeses.

Some strains of *Str. faecalis* have proved particularly proteolytic and attack the milk very much in the same way as does *Penicillium roqueforti*. The authors, therefore, intend to examine in a future study whether the degradation products of casein due to the fecal streptococci are similar to those due to *Penicillium*.

Bibliographie

- [1] MILLER (Ilse), KANDLER (O.) (1967). — *Milchwissenschaft*, 22 (3), p. 150-59.
- [2] DOLEZALEK (J.) (1967). — *Sb. Vys. Chem.-technol. Praze, E 15*, p. 59-67.
- [3] KNAUT (T.), KARNICKA (H.), USAJEWICZ (I.) (1966). — *XVIII Int. Dairy Congr. D.*, p. 515-522.
- [4] MILLER (Ilse), KANDLER (O.) (1967). — *Milchwissenschaft*, 22 (10), p. 608-15.
- [5] ANNIBALDI (S.) (1970). — *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, XXI (I), p. 27-34.
- [6] BIANCHI-SALVADORI (B.) (1969). — *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, XX (I).
- [7] SALVADORI (P.), BIANCHI (B.), CAVALLI (V.) (1962). — *XVI Congrès Int. Lait.*, B, p. 455-463.
- [8] SALVADORI (P.), BIANCHI (B.), CAVALLI (V.) (1962). — *Il Latte* (I), p. 18-22.
- [9] SALVADORI (P.), BIANCHI (B.), CAVALLI (V.) (1964). — *Le Lait*, tome XLIV, p. 129-138.
- [10] SALVADORI (P.), BIANCHI (B.) (1967). — *Le Lait*, n° 469/470, p. 605-611.
- [11] MOORE (S.), STEIN (W. H.), SPACHMANN (D.) (1958). — *Anal. Chem.*, 30, p. 1185.
- [12] MOORE (S.), STEIN (W. H.), SPACHMANN (D.) (1958). — *Anal. Chem.*, 30, p. 1190.

Reçu pour publication en février 1971.