

Aptitude des streptocoques lactiques à la protéolyse

I. — ETUDE DE L'ACTION DE STREPTOCOQUES LACTIQUES MESOPHILES SUR LES CONSTITUANTS AZOTES DU LAIT

par

KIKUCHI T.* , DESMAZEAUD M. et BERGERE J. L.

*Laboratoire de Biochimie Microbienne, I.N.R.A., C.N.R.Z.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

Les streptocoques lactiques mésophiles sont présents dans tous les types de fromages. Malgré leur activité protéolytique faible, leur rôle dans la maturation des fromages est indéniable mais leur importance relative est matière à controverse surtout dans le cas des fromages où interviennent d'autres micro-organismes, bactéries ou surtout moisissures, à activité protéolytique plus prononcée.

Vu le peu de données dont on dispose sur l'activité protéolytique des bactéries lactiques ceci n'a rien d'étonnant.

Pour progresser dans ce domaine deux voies sont possibles :

a) Faire un inventaire détaillé du système protéolytique de ces bactéries comme cela a déjà été abordé (Rabier et Desmazeaud, 1973 ; Cowman *et al.*, 1967 a et b) ce qui est nécessaire mais long.

b) Caractériser globalement leur activité protéolytique par la nature des produits formés soit avec des extraits enzymatiques bruts, soit avec des cellules ou même les cultures.

C'est cette deuxième voie qui a été choisie dans le présent travail. Il a d'abord été examiné si l'analyse des différentes fractions azotées de cultures sur lait pouvait permettre de classer les souches de diverses espèces de streptocoques lactiques mésophiles et éventuellement de les sélectionner dans un but appliqué. Evidemment il resterait à démontrer qu'il existe une corrélation avec les observations faites en technologie fromagère.

* Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co. Ltd 27-1, 3-Chome, Akabanekita, Kita-Ku (Japon).

MATERIEL ET METHODES

1) Micro-organismes

Les différentes souches utilisées dans ce travail sont *S. lactis* CNRZ 31, CNRZ 261, CNRZ 27 CA 2 et CNRZ 71 CA 2 ; *S. cremoris* KH, 1 P 5, ML 1, C 13 et CNRZ 292 PCA 3 ; *S. diacetilactis* DRC 1, DRC 2, CNRZ 258 et CNRZ 269. Ces souches sont conservées à l'état lyophilisé.

2) Conditions de culture

Deux précultures successives sur lait autoclavé tournesolé sont d'abord effectuées à partir de chaque souche lyophilisée. Ces précultures sont incubées à la température de 30° C jusqu'à ce que le lait soit caillé. Les temps d'incubation sont de 15 h à 20 h pour les souches à acidification normale et de 3 j à 5 j pour les souches *S. lactis* CNRZ 71 CA 2 et *S. cremoris* CNRZ 292 PCA 3 à acidification lente.

Ensuite pour chaque souche 2 flacons de 100 ml de lait sontensemencés chacun avec 1 ml de la deuxième préculture. Le lait utilisé est du lait cru écrémé ayant subi un traitement U.H.T. (145° C pendant 15 s) dans un appareil Laguilharre à injection de vapeur et réparti aseptiquement en flacons. Ce type de traitement de stérilisation a été retenu parce que c'est celui qui dénature le moins les protéines du lait (Burton, 1969). Deux flacons du même lait nonensemencé sont incubés à la température de 30° C pendant le même temps et servent de témoins. Les différentes fractions azotées sont ensuite déterminées sur ces cultures après un examen microscopique destiné à détecter une contamination éventuelle.

3) Mesures et dosages

3.1. Mesure du pouvoir acidifiant

Les différentes souches ont d'abord été caractérisées par leur aptitude à produire de l'acide en mesurant le pH et la quantité d'acide produite après 6 h d'incubation à 30° C sur les cultures de chaque souche effectuées dans le lait U.H.T.

Les mêmes mesures sont également effectuées sur ces cultures après 16 h et 10 j d'incubation.

3.2. Dosage des différentes formes d'azote soluble

Après 10 j d'incubation 50 ml de lait de chacun des flaconsensemencés et des témoins sont mélangés à 50 ml d'une solution de citrate 0,5 M à pH 7,0 afin de remettre en solution les protéines précipitées. Ensuite, les différentes formes d'azote solubilisé sont fractionnées sur ce mélange de la manière suivante :

— par abaissement du pH. Une solution d'acide chlorhydrique N est ajoutée à 25 ml du mélange jusqu'à obtention d'un pH de 4,60

puis le volume est amené à 50 ml avec de l'eau distillée. Après 16 h de contact à température ordinaire, les protéines précipitées sont éliminées par filtration sur papier Durieux n° 111,

— par action de l'acide trichloracétique (TCA) à 12 p. 100. A 100 ml du mélange sont ajoutés 10 ml d'une solution à 24 g d'acide trichloracétique pour 100 ml d'eau distillée. Après 16 h de contact le précipité est éliminé comme ci-dessus,

— par action de l'acide phosphotungstique (APT). A 10 ml du mélange sont ajoutés 5 ml d'une solution à 4 g d'acide phosphotungstique pour 100 ml d'eau distillée et 5 ml d'une solution d'acide sulfurique à 25 p. 100 (v/v). Après 16 h de contact le précipité est éliminé comme ci-dessus.

L'azote total du lait et celui contenu dans les différents filtrats est dosé par la méthode Kjeldahl après minéralisation de 1 ml de mélange ou de 4 ml de filtrat. Les résultats sont exprimés en μg d'azote (N) par ml de culture.

En outre sur chacun des filtrats les groupements NH_2 libres sont dosés par coloration à la ninhydrine. Un ml de filtrat additionné de 1 ml du réactif à la ninhydrine (Moore et Stein, 1954) est porté au bain-marie bouillant pendant 15 mn. Après refroidissement et addition de 8 ml d'alcool à 50 p. 100 la densité optique à 570 nm est lue à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman B en utilisant une cuve de verre de 1 cm de chemin optique. La densité optique est ensuite transformée en équivalent leucine en se référant à une gamme étalon et exprimée en μg d'azote équivalent leucine (N-NH_2) par ml de culture.

On étudie ainsi les fractions suivantes :

- l'azote total (NT) de la culture,
- l'azote soluble total (NST) après précipitation à pH 4,6,
- l'azote non protéique (NPN) après précipitation au TCA à 12 p. 100,
- l'azote soluble après précipitation à l'acide phosphotungstique (NSAPT), comprenant des peptides de bas poids moléculaire et les acides aminés à l'exclusion des diamines (Mogensen, 1948).

Bien entendu les résultats obtenus par les deux méthodes de dosage (Kjeldahl et ninhydrine) ne sont pas rigoureusement comparables même lorsqu'il s'agit d'une solution contenant uniquement des acides aminés. En effet le rendement de la coloration à la ninhydrine n'est pas tout à fait le même pour tous les acides aminés. Cependant les variations par rapport à la leucine sont faibles (0,96 à 1,10 au lieu de 1,04) sauf pour la proline qui donne une coloration environ 5 fois plus faible (0,225) que la leucine. Mais surtout la teneur en azote n'est pas la même pour tous les acides aminés.

Il en résulte que le rapport azote total / azote NH_2 (en équivalent leucine) peut varier suivant les acides aminés. Ce rapport reste cependant compris entre 0,73 et 2,6 pour la plupart des acides

aminés sauf pour l'arginine (4,9) en raison de sa teneur en azote et la proline (0,5) faiblement colorée par la ninhydrine. Il est en moyenne de 1,65 ou de 1,5 suivant qu'on inclut ou non la proline et l'arginine. D'autre part le rendement de la coloration pour un acide aminé donné en position NH_2 -terminale peut varier suivant le nombre d'acides aminés du peptide qui le contient (Lederer, 1960). Donc dans le cas d'un mélange de peptides et d'acides aminés on obtient des résultats par défaut.

Cependant la comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes donne une indication sur la composition de chaque fraction azotée et surtout permet de comparer entre eux deux échantillons d'une même fraction.

Ainsi par exemple deux échantillons A et B de fraction soluble dans le TCA à 12 p. 100 ont la même teneur en azote Kjeldahl. Supposons que la teneur en N-NH_2 de l'échantillon A est dix fois plus grande que celle de l'échantillon B. Cela montre que le premier est beaucoup plus riche que le second en composés azotés de bas poids moléculaire (courts peptides et acides aminés). Si les rapports N/N-NH_2 sont ≤ 2 pour A et de 15-20 pour B par exemple, cela tend à prouver que A contient essentiellement des acides aminés alors que B contient plutôt des peptides dont le nombre de résidus d'acides aminés est au moins de l'ordre d'une dizaine.

RESULTATS

I. — Production d'acide par les différentes souches

Les différentes souches des espèces étudiées provenant de notre collection ont été choisies en fonction de leur activité c'est-à-dire de leur aptitude à produire de plus ou moins grandes quantités d'acide lactique dans un intervalle de temps donné. Ces souches peuvent se classer en trois catégories (tab. 1), d'après leur activité mesurée suivant le test habituel (acidité après 6 h d'incubation dans du lait reconstitué chauffé à 80° C pendant 30 mn (Accolas et *al.*, 1971) : celles à forte activité (AF), celles à activité moyenne (AM) enfin des souches à très faible activité (Af) nécessitant même plusieurs jours pour cailler le lait.

Comme le montrent les résultats du tableau 1 le comportement de certaines souches dans le lait U.H.T. est différent de ce qu'on observe par le test habituel de mesure de l'acidité dans du lait en poudre reconstitué, simplement chauffé à 80° C. Ceci est particulièrement net pour l'espèce *S. cremoris* où le classement des souches est même inversé. Ce fait peut être expliqué par l'importance de l'influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries lactiques (Auclair, 1964). En outre on remarquera la très faible activité de deux souches faiblement acidifiantes de *S. cremoris* et *S. lactis* dont le comporte-

TABLEAU 1. — Production d'acide par les différentes souches

Espèce et souche*	Temps d'incubation	
	6 h	16 h
<i>S. lactis</i>		
CNRZ 261 (AF)	55,0	87,0
CNRZ 31 (AF)	36,5	84,5
CNRZ 27 CA 2 (AM)	32,0	84,0
CNRZ 71 CA 2 (Af)	19,0	26,5
<i>S. cremoris</i>		
C 13 (AM)	45,0	85,0
ML 1 (AM)	40,0	82,0
KH (AF)	21,0	61,0
1 P 5 (AF)	19,5	46,0
CNRZ 292 PCA 3 (Af)	17,5	21,0
<i>S. diacetylactis</i>		
CNRZ 248 (AF)	57,0	88,5
DRC 2 (AF)	56,0	88,0
DRC 1 (AM)	56,0	89,0
CNRZ 269 (AM)	39,5	84,0

Acidité exprimée en degré Dornic, l'acidité du lait témoin non ensemencé et incubé à 30° C est de 16.

* AF, forte acidité ; AM, activité moyenne et Af, activité faible.

ment reste d'ailleurs le même que le lait ait subi un chauffage du type U.H.T. ou simplement à 80° C.

Après 10 j d'incubation le pH des cultures des différentes souches est compris entre 4,35 et 4,55 et l'acidité entre 72,0° D et 83,0° D sauf pour les deux souches faiblement actives, *S. lactis* CNRZ 71 CA 2 et *S. cremoris* CNRZ 292 PCA 3 dont les pH sont respectivement de 4,65 et 5,50 et les acidités de 67,5° D et 43° D.

II. — Quantité d'azote et teneur en groupements aminés dans les différentes fractions azotées des cultures de streptocoques lactiques

1) Variation selon les souches

Les quantités des différentes formes d'azote présentes dans les laits après 10 j d'incubation en présence de différentes souches figu-

TABLEAU 2

Proportion des différentes formes d'azote solubles présentes dans les cultures des diverses souches de streptocoques lactiques

Espèce et souche	NST	NPN	NSAPT
Lait incubé à 30° C	18,1	4,98	4,05
<i>S. lactis</i>			
CNRZ 261	15,1	10,2	4,94
CNRZ 31	17,1	8,23	4,43
CNRZ 27 CA 2	17,4	10,4	4,11
Moyenne	16,5	9,62	4,48
CNRZ 71 CA 2	16,3	4,90	3,99
<i>S. cremoris</i>			
C 13	20,9	12,9	5,83
ML 1	19,1	10,1	4,85
KH	20,2	12,3	5,52
1 P 5	17,7	12,1	5,26
Moyenne	19,5	11,8	5,36
CNRZ 292 PCA 3	15,4	4,94	4,32
<i>S. diacetylactis</i>			
CNRZ 258	18,5	10,3	5,16
DRC 2	19,8	11,3	5,79
DRC 1	20,2	10,9	5,90
CNRZ 269	20,7	11,9	5,64
Moyenne	19,8	11,1	5,61

Les résultats sont exprimés en p. 100 de l'azote total.

Les 2 souches de *S. lactis* et *S. cremoris* faiblement acidifiantes sont considérées à part.

rent dans le tableau 2. A l'intérieur d'une même espèce la comparaison des résultats montre assez peu de différences entre les diverses souches à forte ou moyenne activité acidifiante quelle que soit la fraction azotée considérée.

Pour chaque fraction d'azote soluble les écarts observés entre la valeur la plus forte et la plus faible sont de l'ordre de 100 µg par ml ou inférieurs à cette valeur sauf chez *S. cremoris* où ils atteignent

154 μg pour la fraction soluble dans le TCA à 12 p. 100 (NPN). Dans bien des cas la différence entre deux souches d'une même espèce est inférieure ou égale à l'écart inhérent à la précision de la méthode de mesure.

Les teneurs en groupements aminés libres de chaque fraction azotée (tab. 3) varient également assez peu d'une souche à l'autre à l'intérieur d'une même espèce.

TABLEAU 3

Teneur en groupements NH_2 libres dans les différentes fractions azotées solubles présentes dans les cultures de diverses souches de streptocoques lactiques

Espèce et souche	Fractions azotées		
	NST	NPN	NSAPT
Lait témoin à 30° C	102	56	48
<i>S. lactis</i>			
CNRZ 261	146	132	90
CNRZ 31	120	110	80
CNRZ 27 CA 2	120	120	106
Moyenne	128	120	92
CNRZ 71 CA 2	70	56	56
<i>S. cremoris</i>			
C 13	196	194	122
ML 1	148	123	98
KH	186	180	102
1 P 5	170	152	108
Moyenne	175	162	107
CNRZ 292 PCA 3	96	76	58
<i>S. diacetylactis</i>			
CNRZ 258	164	152	90
DRC 2	182	176	102
DRC 1	186	170	138
CNRZ 269	196	188	116
Moyenne	182	171	111

Résultats exprimés en μg d'azote leucine par ml de lait.

Seules les deux souches faiblement acidifiantes ont un comportement nettement différent des autres aussi bien chez *S. cremoris* que chez *S. lactis*. La quantité d'azote des différentes fractions solubles est plus faible que pour les autres souches. Les différences les plus marquées concernent l'azote non protéique (NPN).

Par ailleurs pour ces deux souches les teneurs en groupements aminés, libres des diverses fractions azotées sont plus basses (de 30 à 60 p. 100) que pour les autres souches des mêmes espèces.

2) Variation selon les espèces

Les trois espèces étudiées peuvent être comparées d'abord en considérant les moyennes établies à partir des résultats des différentes souches pour la teneur en azote (tab. 2) et pour la teneur en groupements aminés libres (tab. 3) de chaque fraction. Les deux souches faiblement acidifiantes sont considérées à part du fait de leur comportement particulier.

Pour cette comparaison il est cependant plus intéressant d'examiner les variations de chaque fraction par rapport à la fraction correspondante du lait incubé nonensemencé (tab. 4).

En ce qui concerne les variations de la teneur en azote les principales différences entre espèces portent sur plusieurs fractions.

L'azote soluble total (NST) augmente de 9,6 et 11 p. 100 dans les cultures de *S. cremoris* et *S. diacetylactis* alors qu'il diminue (6 p. 100) dans celle de *S. lactis*.

L'azote non protéique (NPN) augmente pour toutes les espèces qui se classent dans l'ordre suivant : *S. cremoris* > *S. diacetylactis* > *S. lactis*. Le classement est le même pour l'azote soluble dans l'APT.

Lorsqu'on considère la teneur en groupements aminés des différentes fractions azotées les principales différences portent sur les fractions les plus solubles. Pour les fractions NPN le classement est le suivant : *S. diacetylactis* > *S. cremoris* > *S. lactis*.

Pour l'azote soluble dans l'APT le classement est le même sauf que les différences entre espèces sont moins marquées.

Les résultats tels qu'ils sont exprimés dans le tableau 4 traduisent très nettement les différences de comportement des deux souches faiblement acidifiantes non seulement par rapport aux autres souches de la même espèce mais aussi par rapport aux autres espèces.

Pour les deux souches on constate une augmentation nette de la fraction insoluble à pH 4,6, une faible diminution de la fraction NST-NPN et pas de variation du NPN. Toutefois elles diffèrent entre elles par le fait que :

— chez *S. lactis* CNRZ 71 CA 2 il n'y a pas de variation de l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique,

TABLEAU 4. — Variation relative des différentes formes d'azote et de leur teneur en groupement NH₂-libre pour les diverses espèces de streptocoques lactiques étudiées

Espèce		Fractions azotées				
		NT-NST	NST	NST-NPN	NPN	NSAPT
<i>S. lactis</i>	N	+ 1,1	— 5,9	— 47	+ 92	+ 9,9
	N-NH ₂		+ 26	— 83	+ 126	+ 92
<i>S. lactis</i> CNRZ 71 CA 2 (Af.)	N	+ 3,8	— 8,6	— 12	0	0
	N-NH ₂		— 31	— 78	0	+ 16
<i>S. cremoris</i>	N	— 0,1	+ 9,5	— 40	+ 141	+ 35
	NH ₂		+ 71	— 72	+ 189	+ 124
<i>S. cremoris</i> CNRZ 292 PCA 3 (Af.)	N	+ 4,2	— 3,8	— 19	0	+ 7,6
	NH ₂		— 5,9	— 57	+ 36	+ 21
<i>S. diacetylactis</i>	N	— 1,0	+ 11	— 33	+ 125	+ 40
	NH ₂		+ 78	— 67	+ 206	+ 132

Pour chaque fraction les résultats calculés à partir des moyennes établies dans les tableaux 2 et 3 sont exprimés en p. 100 de l'azote ou de l'azote-NH₂ du témoin.

— chez *S. cremoris* CNRZ 292 PCA 3 cette fraction augmente faiblement, et surtout la teneur en groupements NH_2 libres augmente dans le NPN et les fractions dégradées.

Donc, mises à part ces deux souches faiblement acidifiantes, on constate une analogie de comportement entre les trois espèces mésophiles et surtout entre *S. cremoris* et *S. diacetylactis*.

III. — Caractéristiques de l'évolution de la matière azotée du lait résultant de l'action des streptocoques lactiques étudiés

Dans le paragraphe précédent il a été montré que les streptocoques lactiques étudiés peuvent être classés en trois groupes suivant la répartition des formes de l'azote présentes dans les cultures sur lait. L'examen des résultats obtenus tels qu'ils sont indiqués dans les tableaux 2, 3, 4 et 5 permet de dégager les points essentiels qui caractérisent l'action de ces trois groupes de bactéries sur la matière azotée du lait.

1) Souches à acidification normale

La variation de l'azote soluble total (NST) est faible, elle ne représente pas plus de 2 p. 100 de l'azote total ou 3 p. 100 de l'azote insoluble à pH 4,6. La proportion d'azote non protéique apparue est un peu plus forte, 6 à 7 p. 100 de l'azote total. Dans cette fraction la variation porte sur l'azote soluble dans l'APT (acides aminés et très courts peptides) mais surtout sur la fraction insoluble à l'acide phosphotungstique dont l'augmentation représente dans certains cas jusqu'à 75 p. 100 de celle du NPN. Les variations des teneurs en groupements aminés sont beaucoup plus élevées que celle de l'azote pour toutes les fractions solubles ce qui traduit le fait que les produits apparus sont de poids moléculaires inférieurs à ceux du lait témoin. Ceci est net si l'on considère la variation du rapport $\text{N}/\text{N-NH}_2$ (tab. 5) particulièrement dans le cas de la fraction NST où il diminue par exemple de 7,9 à 4,9 pour *S. diacetylactis*.

Ce rapport n'est pas tellement plus élevé que dans les fractions NPN et même NSAPT et par ailleurs il n'est que de 3 à 3,5 dans la fraction NPN qui varie le plus, ce qui montre bien que les produits solubles apparus sont essentiellement des peptides constitués seulement de quelques résidus d'acide aminé.

La fraction insoluble à pH 4,6 n'offre pratiquement pas de différence par rapport au lait témoin ce qui peut signifier soit qu'elle n'a pas été modifiée soit qu'elle a été solubilisée partiellement mais que la diminution est compensée par l'apport d'autres substances précipitables à pH 4,6 et en particulier les protéines provenant des cellules microbiennes lysées. Cela ne représenterait cependant qu'une faible proportion de caséine solubilisée, l'azote d'origine microbienne ne représentant pas plus de 3 p. 100 de l'azote caséine, soit 2 p. 100 de l'azote total.

Par contre la fraction NST-NPN (protéoses + protéines solubles) diminue très fortement et essentiellement les composés dont le poids moléculaire est le plus faible puisque le rapport N/N-NH₂ augmente comparativement à celui du témoin (tab. 5). Si on compare la diminution de cette fraction et celle présumée de la fraction insoluble à pH 4,6 à l'augmentation de la fraction NPN on constate qu'elles se compensent mais que l'azote NPN apparu semble provenir essentiellement de l'azote protéose-protéine soluble (NST-NPN).

TABLEAU 5

Evolution du rapport N/N-NH₂ pour les différentes espèces de streptocoques lactiques

	NST	NST-NPN	NPN	NSAPT
Lait témoin 30° C	7,9	12,7	4,0	3,8
<i>S. lactis</i> CNRZ 71 CA 2	5,75	38	3,57	2,17
	10,60	37	4,00	3,20
<i>S. cremoris</i> CNRZ 292 PCA 3	5,00	24	3,3	2,20
	7,20	26	2,9	3,33
<i>S. diacetylactis</i>	4,9	36	2,9	2,2

Moyenne des rapports des différentes souches de chaque espèce à l'exception des souches faiblement acidifiantes : CNRZ 71 CA 2 et 292 PCA 3.

En fait cela n'est pas aussi simple car il s'agit de lait U.H.T. dont une partie des protéines solubles ont été plus ou moins dénaturées par le chauffage. Il en résulte que non seulement les fractions insolubles à pH 4,6 ou dans le TCA à 12 p. 100 (NST-NPN) ne correspondent plus à celle du lait cru mais qu'elles sont en plus susceptibles de varier au cours de l'incubation (tab. 6).

2) *Streptocoques mésophiles faiblement acidifiants*

Les deux souches de *S. cremoris* et *S. lactis* faiblement acidifiantes diffèrent assez peu l'une de l'autre.

Elles sont caractérisées d'abord par une faible diminution de l'azote soluble total (NST), aucune variation du NPN ni de l'azote aminé (NSAPT) sauf pour *S. cremoris* 292 PCA 3 où l'augmentation est très faible.

TABLEAU 6

Répartition des différentes formes de l'azote et de leur teneur en groupement aminé en fonction des traitements subis par le lait

Traitement subi par le lait	NT-NST	NST	NST-NPN	NPN	NSAPT
Lait cru	3 962	1 386 140	1 176 100	210 50	154 38
Lait U.H.T. non incubé	4 424	728 80	525 30	203 54	175 38
Lait U.H.T. incubé 10 j à 30° C	4 270	882 108	665 40	217 54	175 42

Pour chaque fraction :

- le premier chiffre concerne l'azote en μg par ml de lait ;
- le deuxième chiffre concerne la teneur en groupement aminé exprimée en μg d'azote leucine par ml de lait.

La teneur en groupements aminés varie peu par rapport aux autres souches, et en particulier elle diminue dans l'azote soluble total. Le rapport $\text{N}/\text{N-NH}_2$ ne varie que très peu et même augmente dans la fraction NST de *S. lactis* 71 CA 2.

Enfin chez ces deux souches l'azote de la fraction insoluble à pH 4,6 augmente mais moins que chez *S. thermophilus*.

Donc ces résultats traduisent une faible modification des fractions azotées du lait.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La première remarque importante que suggère l'examen des résultats est la faible activité protéolytique manifestée par les streptocoques lactiques en culture sur lait en particulier si on les compare à d'autres bactéries telles que par exemple certains *Bacillus*, certains *Clostridium* ou *S. faecalis* var. *liquefaciens* qui hydrolysent très fortement les protéines dans les mêmes conditions. Ces résultats ne diffèrent guère de ceux obtenus par d'autres auteurs avec d'autres souches des mêmes espèces de bactéries lactiques en culture sur lait

par exemple (Collins et Nelson, 1949 ; Jespersen, 1966 ; Rapp, 1969 ; Poznanski et al., 1968 ; Miller et Kandler, 1967 ; Van der Zant et Nelson, 1953 ; Braz et Allen, 1939) ou même parfois sur lait autoclavé (Jago, 1962 ; Rapp, 1969). La première raison est que tout ou partie des produits d'hydrolyse est transformé en protéines par les bactéries. Cependant même si on tient compte de ce fait la protéolyse dans les cultures reste faible. La deuxième raison est que le bas pH des cultures, dû à l'acidification, n'est certainement pas favorable à l'activité des systèmes protéolytiques de ces bactéries. Il a été montré effectivement que l'addition de carbonate au lait (Braz et al., 1939) et surtout le maintien du pH des cultures de *S. lactis* à une valeur voisine de 7,0 permet d'obtenir 4 à 5 fois plus d'azote non protéique (NPN) qu'à pH 5,0 (Van der Zant et al., 1953).

L'action des différentes espèces de streptocoques lactiques étudiés sur les composés du lait se traduit essentiellement par l'accumulation de fractions azotées de faible poids moléculaire, petits peptides et acides aminés. Ces résultats confirment ceux obtenus avec d'autres souches des mêmes espèces (Miller et al., 1939 ; Morgan et Nelson, 1951 ; Carini et al., 1969 ; Dolezalek, 1966 ; Klimovski et al., 1969 ; Van der Zant et al., 1954 ; Rymaszewski et Poznanski, 1968). Par ailleurs on remarque que les fractions azotées les moins solubles évoluent différemment. Si la fraction précipitable par le TCA (NST-NPN) essentiellement (protéose-peptone et protéines solubles) diminue notablement pour toutes les souches étudiées, la fraction précipitable à pH 4,6 par contre reste à peu près constante ou même augmente légèrement comme cela a déjà été constaté pour *S. lactis* ou *S. cremoris* (Braz et al., 1939 ; Ohmiya et Sato, 1968). On sait par ailleurs qu'au lieu d'attaquer la caséine la plupart des souches de streptocoques lactiques utilisent préférentiellement des produits plus dégradés (Mc Donald, 1956).

Un point important est la faible différence observée d'une part entre les différentes souches d'une même espèce et d'autre part entre les espèces, à l'exclusion des souches anormalement lentes. Ce phénomène n'est pas particulier aux souches que nous avons étudiées comme le montrent les résultats obtenus pour différentes souches par d'autres auteurs et dans des conditions semblables (Lame, Jespersen, 1966 ; Miller et al., 1967 ; Rapp, 1969 ; Van der Zant et al., 1953), ou entre différentes espèces (Poznanski et al., 1968 ; Dolezalek, 1966 ; Shidlovskaya et D'Yachenko, 1968 ; Rapp, 1969 ; Klimovski et al., 1969). Toutefois si les différences sont faibles il apparaît nettement que *S. cremoris* et *S. diacetylactis* ont une activité protéolytique un peu plus forte que *S. lactis* comme cela a déjà été observé par certains des auteurs précédemment cités. La différence de comportement des souches à acidification lente et limitée est un phénomène également connu (Lame, 1966 ; Harriman et Hammer, 1931 ; Citti, Sandine et Elliker, 1965) qui est à l'origine de travaux très approfondis sur les enzymes protéolytiques de *S. lactis*. Les faibles modifica-

tions de la composition en matière azotée du lait par ces souches sont dues d'une part à leur croissance lente et même limitée, particulièrement pour *S. cremoris* CNRZ 292 PCA 3 et d'autre part très certainement aux différences qui existent entre les enzymes de ces souches et celles des souches plus actives (Westhoff et Cowman, 1971).

Les résultats de ce travail montrent que par culture sur lait et même en mesurant plusieurs fractions azotées, il n'apparaît pas de différences suffisamment marquées pour classer les souches de streptocoques mésophiles surtout à l'intérieur d'une même espèce, ou pour choisir telle souche plutôt que telle autre en vue d'une étude plus approfondie sur leur système protéolytique ou leur mode d'action sur la caséine.

Il est possible que les différences qui existent entre les systèmes protéolytiques de ces souches de bactéries soient effectivement faibles, et dans ces conditions on peut penser que le comportement de l'une d'entre elles (à l'exclusion de celles qui acidifient faiblement) reflètera le type d'action propre à chaque espèce et qu'il donnera également un aperçu du type d'action des espèces voisines du groupe des streptocoques mésophiles.

Toutefois, compte tenu que les mesures effectuées portent sur des cultures et qu'elles ne traduisent que l'action globale d'un nombre plus ou moins grand d'enzymes sur un substrat qui ne comprend pas que des protéines, il est concevable que les différences susceptibles d'exister entre souches soient masquées. Seule une étude plus approfondie de l'action des systèmes protéolytiques de ces bactéries sur les caséines, pourra montrer si d'une souche à l'autre ou d'une espèce à l'autre il existe des différences importantes. Il faudrait en outre connaître leur rôle au niveau du fromage pour savoir si ces différences ont une importance dans la maturation et définir sur quels critères on doit les sélectionner dans un but technologique.

Résumé

L'aptitude à la protéolyse de *S. lactis*, *S. cremoris* et *S. diacetylactis* en culture sur lait a été étudiée en vue de sélectionner des souches pour une étude plus approfondie de leur système protéolytique et éventuellement dans un but appliqué.

Après 10 j de culture, les fractions azotées solubles à pH 4,6, dans le TCA à 12 p. 100 et dans l'acide phosphotungstique ont été déterminées ainsi que leur teneur en groupements aminés libres.

A l'intérieur d'une même espèce il y a assez peu de différences entre les diverses souches à forte ou moyenne activité acidifiante quelle que soit la fraction azotée considérée. D'ailleurs la quantité des produits solubles apparus reste relativement faible et elle est pratiquement nulle dans le cas des souches faiblement acidifiantes.

De même les différences entre espèces sont relativement faibles surtout entre *S. cremoris* et *S. diacetylactis* qui sont un peu plus protéolytiques que *S. lactis*.

L'action de ces bactéries sur les composés azotés du lait se traduit essentiellement par l'accumulation de composés de faibles poids moléculaire : peptides et acides aminés et une hydrolyse très faible de la fraction caséine.

Summary

PROTEOLYTIC ACTION OF LACTIC ACID *STREPTOCOCCI*

I. — Nitrogen fractions of milk cultures of mesophilic *streptococci*

The proteolysis by *S. lactis*, *S. cremoris* and *S. diacetylactis* in skim milk cultures has been studied in order to choose strains for further studying their proteolytic system and possibly for their utilisation in cheesemaking.

Non casein nitrogen, non protein nitrogen, soluble nitrogen in phosphotungstic acid and the amino nitrogen of these fractions has been determined.

Low differences in the nitrogen fractions of ten days cultures were observed between fast and moderately fast acid producing strains of the three species. In the other part the amounts of soluble products were weak particularly for slow acid producing strains.

Likewise the three species showed low differences especially between *S. cremoris* and *S. diacetylactis* which were a little more proteolytic than *S. lactis*.

Proteolysis displayed an increase in low molecular weight nitrogen compounds (peptides and amino acids) and small changes for casein nitrogen.

Reçu pour publication le 2 avril 1973.

Bibliographie

- ACCOLAS (J. P.), VEAUX (M.) et AUCLAIR (J.) (1971). — Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 51, 249-272.
- AUCLAIR (J.) (1964). — Les substances antibactériennes du lait cru et leur rôle en technologie laitière. *Microbial inhibitors in Food*, Almquist et Wiksell, Stockholm, 281-296.
- BRAZ (M.) and ALLEN (L. A.) (1939). — Protein metabolism and acid production by the lactic acid bacteria in milk. Influence of yeast extract and chalk. *J. Dairy Res.*, 10, 20-34.

- BURTON (A.) (1969). — Ultra-high temperature processed milk. *Dairy Sci. Abstr.*, 31, 287-297.
- CARINI (S.), RESMINI (P.) et BOZZOLATI (M.) (1969). — Proteolisi della caseina da parte di streptococchi e satteri lattici. *Scienza Tech. Lattiero-Casearia*, 20, 289-304.
- CITTI (J. E.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1965). — Comparison of slow and fast acid producing *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 48, 14-18.
- COLLINS (E. B.) and NELSON (F. E.) (1949). — The effect of *Streptococcus lactis* and coliform organism on the soluble nitrogen of milk. *J. Dairy Sci.*, 32, 652-658.
- COWMAN (R. A.) and SPECK (M. L.) (1967). — Proteinase enzyme system of lactic streptococci. I. Isolation and partial characterization. *Appl. Microbiol.*, 15, 851-856.
- COWMAN (R. A.), SWAISGOOD (H. E.) and SPECK (M. L.) (1967). — Proteinase enzyme of lactic streptococci. II. Role of membrane proteinase in cellular function. *J. Bacteriol.*, 94, 942-948.
- COWMAN (R. A.), YOSHIMURA (S.) and SWAISGOOD (H. E.) (1968). — Proteinase enzyme system of lactic streptococci. III. Substrate specificity of *Streptococcus lactis* intracellular proteinase. *J. Bacteriol.*, 95, 181-187.
- DOLEZALEK (J.) (1966). — Proteolytic activity of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetilactis*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus casei*. XVII Int. Dairy Congr. D, 523-526.
- Mc DONALD (I. J.) (1956). — Utilisation of sodium caseinate by lactic streptococci and enterococci. *Can. J. Microbiol.*, 2, 607-610.
- HARRIMANN (L. A.) and HAMMER (B. W.) (1931). — Variations in the coagulation and proteolysis of milk by *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 14, 40.
- JAGO (G. R.) (1962). — Proteolysis of milk proteins in relation to bitter flavour in cheese. *Aust. J. Dairy Techn.*, 17, 83-85.
- JESPERSEN (T. N.) (1966). — Proteolytic activity of some lactic acid bacteria. XXII Int. Dairy Congr., D, 465-470.
- KLIMOVSKI (I. I.), ZVYAGINTSEV (I.) et GUDKOV (A. V.) (1969). — Comparative studies of products of proteolysis by different types of lactic streptococci. *Moloch. Prom.*, 30, 26-32.
- LAME (H.) (1966). — Etude sur la production en masse de bactéries lactiques mésophiles en vue de leur utilisation pour accélérer la maturation des fromages. II. Contribution à l'étude de leur activité protéolytique. Thèse Doc. Ing. Sci., Université de Poitiers.
- LEDERER (E.) (1960). — In *Chromatographie en chimie organique et biologique*, Masson et Cie, Paris, vol. II, tome III, 368-369.
- MILLER (I.) und KANDLER (O.) (1967). — Eiweissabbau und anreicherung freier aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch, *Milchwiss.*, 22, 150-159.
- MOGENSEN (M. T. S.) (1948). — Determination of the degree of proteolytic decomposition in cheese with special reference to the formol titration. *Meddelande NR21 från Statens mejeriförsök*, 281-436.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1954). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds, *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913.
- MORGAN (M. E.) and NELSON (F. E.) (1951). — The distribution of certain amino acids in soluble fractions of milk cultures of *S. lactis*. *J. Dairy Sci.*, 34, 446-456.
- OHMIHYA (K.) and SATO (Y.) (1968). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. IV. Changes of the casein treated with *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* or *Streptococcus lactis*. *Agr. Biol. Chem.*, 32, 291-296.

- RABIER (D.) et DESMAZEAUD (M. J.) (1973). — Inventaire des différentes activités peptidasiques intracellulaires de *Streptococcus thermophilus*, *Biochimie*, 55, 389-404.
- RAPP (M.) (1969). — Über das Eiweissabanvermögen von Milchsäurebakterien. *Milchwiss.*, 24, 208-211.
- RYMASZEWSKI (J.) and POZNANSKI (S.) (1968). — The breakdown of γ -casein components by cell suspension of lactic acid bacteria. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 16, 609-614.
- SHIDLOVSKAYA (V. N.) et D'YACHENKO (P. F.) (1968). — The proteolysis of α et β caseins by lactic acid bacteria. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 4, 56-59.
- VAN DER ZANT and NELSON (F. E.) (1953). — Proteolysis by *Streptococcus lactis* grown in milk with and without controlled pH. *J. Dairy Sci.*, 36, 1104-1111.
- VAN DER ZANT and NELSON (F. E.) (1954). — Amino acid and peptides in the protein free fractions of milk before and after incubation with *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 37, 790-794.
- WESTHOFF (D. C.) and COWMAN (R. A.) (1971). — Substrate specificity of the intracellular proteinase from a slow acid producing mutant of *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 54, 1265-1269.
-