

La flore bactérienne indologène aéro-anaérobie des laits pasteurisés conditionnés

(CAS PARTICULIER D'*AEROMONAS*)

(suite)*

par

Madame Louise VEILLET-PONCET

.....

V. — INTERPRETATION DE LA PRESENCE D'*AEROMONAS* DANS LES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES

.....

L'intérêt des *Aeromonas* nous semble présenter à l'heure actuelle, trois aspects :

- 1° en pathologie de Poïkilothermes,
 - 2° en pathologie des Homéothermes,
 - 3° en bactériologie alimentaire.
-

1.3. *Aeromonas* et bactériologie alimentaire

Il est vraisemblable que c'est Zimmermann en 1890 qui le premier met en évidence dans l'eau du robinet, *Bacillus punctatus*, reconnu aujourd'hui comme étant *Aeromonas punctata*, et qui ainsi pose le problème de la présence d'*Aeromonas* dans les eaux d'alimentation. C'est depuis 1962, grâce aux travaux de Leclerc et Buttiaux que l'on peut considérer *Aeromonas* comme une bactérie faisant partie de la flore normale non seulement des eaux en général mais des eaux de distribution en particulier, que ces eaux soient traitées ou non.

En ce qui concerne les denrées alimentaires proprement dites, Kielwein et al. rapportent qu'en 1936 Aitken isole *Aeromonas* d'un pâté à base de viande et qu'en 1959, Eddy et Kitchell signalent la

* *Le Lait*, n° 537, juillet-août 1974.

présence d'*Aeromonas hydrophila* dans la viande congelée. Par ailleurs, *Proteus melanovogenes*, responsable de l'altération des œufs de poule, observée en 1937 par Miles et Halman n'est autre qu'*Aeromonas*. En 1959, Buttiaux pense qu'*Aeromonas* joue un rôle dans la fabrication du saucisson cru. En 1967, nous isolons pour la première fois *Aeromonas* du lait pasteurisé conditionné et en 1968 du lait cru réfrigéré, en étudiant la flore psychotrophe. De leur côté, en 1969, Kielwein et *al.* signalent la présence d'*Aeromonas* dans 17 p. 100 des laits crus contrôlés et étudient quelques-unes des propriétés d'*Aeromonas*, en même temps que celles de *Pseudomonas*, ayant une incidence sur la qualité des produits laitiers.

2) Discussion

Cette revue bibliographique nous montre que les *Aeromonas* sont connus depuis longtemps en ichtyopathologie, qu'ils sont isolés chez l'homme, malade ou sain, depuis moins de 20 ans et que le problème posé par les *Aeromonas* en bactériologie alimentaire proprement dite est récent.

Les travaux concernant *Aeromonas* en pathologie des Poïkilothermes font ressortir que cette bactérie est particulièrement virulente dans des conditions anormales d'environnement pour l'animal.

Pour l'homme, il est exceptionnel qu'*Aeromonas* soit seul responsable de la maladie : en effet, dans la plupart des cas connus, ou *Aeromonas* est associé à d'autres bactéries, ou il est isolé de sujets présentant des syndromes qui ne sont en rien en relation avec la présence d'*Aeromonas* : nous voyons donc qu'intervient ici, comme pour les Poïkilothermes, la notion de conditions dans lesquelles se trouve l'individu porteur d'*Aeromonas* : l'éclosion de l'infection provoquée par *Aeromonas* a lieu en général chez des sujets se trouvant en état de moindre résistance.

D'autre part, les études faites par Lautrop et par Catsaras et Buttiaux sur un grand nombre de matières fécales montrent que la fréquence de la présence d'*Aeromonas* y est faible. Si l'homme héberge *Aeromonas* au niveau de son tractus intestinal, ce n'est qu'à titre transitoire, et il semble bien que ce n'est qu'à la faveur de conditions particulières qu'il peut y proliférer. D'après les cas rapportés, il ressort que c'est essentiellement *Aeromonas hydrophila* qui pourrait être considéré comme pathogène pour l'homme : l'infection expérimentale provoquée chez la souris par inoculation des différentes espèces d'*Aeromonas* est un argument en faveur d'une telle assertion.

Il semble donc que nous ne pouvons interpréter la présence d'*Aeromonas* dans le lait pasteurisé conditionné comme le témoignage d'une contamination dangereuse ou d'une contamination d'origine fécale, donc suspecte.

IV. — ACTION SUR LE LAIT DES *AEROMONAS* ISOLES ET ETUDE DU SYSTEME ENZYMATIQUE COAGULANT ET PROTEOLYTIQUE CHEZ UNE DES SOUCHES *AEROMONAS HYDROPHILA* ELP 5

Les caractères caséolytique et psychotrophe mis en évidence lors de l'identification des souches nous suggèrent qu'*Aeromonas* peut intervenir dans l'altération du lait, même stocké aux températures de réfrigération.

Nous étudions donc le comportement de nos souches sur milieux au lait et à la caséine, à différentes températures, en fonction du temps, à la suite de quoi nous essayons d'isoler et d'étudier le système enzymatique coagulant et protéolytique de l'une de nos souches.

1) Action sur le lait des souches isolées

1.1. Conditions de culture

— En aéro-anaérobiose : 50 ml de lait (A₆) en ballons de 100 ml sont inoculés avec 0,20 ml d'une suspension bactérienne en eau physiologique provenant d'une culture de 18 h sur milieu gélosé nutritif.

Le tableau 15 donne les températures et temps d'incubation.

— En aérobie : à partir d'une culture de 18 h sur milieu gélosé nutritif, ensemencement en piqûre de milieux gélosés au lait (A₇) et au caséinate (A₈) coulés en boîte de Pétri.

Pour tous ces essais des milieux témoins sont placés dans les mêmes conditions.

1.2. Résultats

Le tableau 15 permet trois observations importantes :

— Le pouvoir coagulant et protéolytique diminue avec l'abaissement de la température pour n'être plus apparent macroscopiquement à 5° C, à l'exception de quelques souches d'*Aeromonas punctata* et d'un nombre plus important de souches d'*Aeromonas hydrophila*. A l'abaissement de la température correspond un allongement du temps requis pour observer la coagulation.

L'activité coagulante et protéolytique est variable selon les espèces et selon les souches dans une même espèce : nous constatons qu'*Aeromonas hydrophila* a un pouvoir coagulant et protéolytique plus accentué qu'*Aeromonas punctata* qui se traduit par une coagulation et une hydrolyse de la caséine plus rapide à toute température.

A première vue, et dans nos conditions d'expérience, les *Aeromonas* étudiés ont moins d'action sur le lait aux basses températures.

TABLEAU 15. — Action sur le lait des souches d'*Aeromonas* isolées (en semi-anaérobiose)

θ	Effectif Espèces Temps	30		162		58		7	
		<i>A. punctata</i>		<i>A. punctata</i> ssp. <i>caviae</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i> ssp. <i>anaerogene</i>	
		C	P	C	P	C	P	C	P
30° C	24 h	30	—	47	—	35	35	3	3
	5 j		30	82	53	23	23	4	4
	7 j			33	109				
15° C		30	30	162	162	58	58	7	7
	24 h	—	—	—	—	—	—	—	—
	5 j	18	4	105	—	46	31	3	2
	7 j	—	14	7	112	4	19	1	1
	14 j	4	4	17	16	4	4	1	1
	21 j	4	4	9	10	4	4		
10° C		26	26	138	138	58	58	5	4
	5 j	—	—	40	—	14	—	—	—
	10 j	7	7	52	63	35	49	3	1
	21 j	10	10	11	40	9	9	1	2
5° C		17	17	103	103	58	58	4	3
	21 j	—	—	—	16	—	17	—	1

C = coagulation.

P = peptonisation décelable macroscopiquement.

θ = température.

TABLEAU 16. — Action sur le lait et le caséinate des souches d'*Aeromonas* isolées (en aérobiose)

θ	Effectif	30		162		58		7	
	Espèces Temps	<i>A. punctata</i>		<i>A. punctata</i> <i>ssp. caviae</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i> <i>ssp. anaerogenes</i>	
		C	L	C	L	C	L	C	L
30° C	24 h	22	—	86	37	50	32	4	2
	48-72 h	1	17	11	12	5	8	2	—
	96 h	7	4	23	69	—	14	—	—
	7 j	—	9	42	44	3	4	1	5
		30	30	162	162	58	58	7	7
15° C	24 h	—	—	10	—	27	18	3	1
	48-72 h	26	4	65	81	19	26	2	—
	96 h	1	—	—	—	—	—	—	—
	7 j	3	26	87	65	12	14	2	6
		30	30	162	146	58	58	7	7
10° C	24 h	—	—	—	—	—	—	—	—
	48-72 h	—	3	—	—	6	3	—	—
	96 h	9	—	38	41	29	30	3	1
	7 j	17	21	16	19	18	17	1	2
		26	24	54	60	53	50	4	3
5° C	24 h	—	—	—	—	—	—	—	—
	48-72 h	—	—	—	—	—	—	—	—
	96 h	—	—	5	—	20	7	—	—
	7 j	11	8	19	10	16	27	3	0
		11	8	24	10	36	34	3	0

C = culture sur milieu gélosé au caséinate.

L = culture sur milieu gélosé au lait.

θ = température.

Dans cette série d'essais, nous notons la valeur du pH des cultures de 24 h à 21 j, selon la température d'incubation ; la valeur minima du pH observée sur les cultures d'*Aeromonas hydrophila* est de 5,75 et sur celles d'*Aeromonas punctata* de 5,35 après 48 h d'incubation.

La coagulation observée par culture sur lait n'est pas une coagulation provoquée par l'acidification du milieu, mais plutôt une coagulation d'origine enzymatique.

Le tableau 16 montre qu'à toute température, nos *Aeromonas* dégradent dans l'ensemble plus rapidement le caséinate que le lait.

Le pouvoir caséolytique s'avère plus intense chez *Aeromonas hydrophila* que chez *Aeromonas punctata*.

Nous observons la même variation du pouvoir protéolytique selon les souches d'une même espèce que dans le cas des cultures observées en semi-anaérobiose.

Ces résultats nous amènent à l'étude plus approfondie du système enzymatique coagulant et protéolytique chez une de nos souches, *Aeromonas hydrophila* ELP 5 choisie parmi celles qui ont donné des résultats positifs à 30° C, 15° C, 10° C et 5° C.

2) Le système enzymatique coagulant et protéolytique chez *Aeromonas hydrophila* ELP 5

2.1. Méthodes

2.1.1. Conditions de culture : à partir d'une suspension bactérienne en eau physiologique provenant d'une culture de 18 h sur milieu gélosé nutritif incliné, inoculation de 6 fioles Erlenmeyer de 500 ml contenant 250 ml de milieu, à raison de 1 ml de suspension par fiole : l'ensemencement représente de 2,5 à 3,10⁷ bactéries.

Ces cultures sont maintenues à 30° C pendant 72 h, sans agitation, dans un bain-marie thermostaté.

2.1.2. Obtention de la solution enzymatique : dans une centrifugeuse réfrigérée (Heraeus type Zeta 17) les cultures sont soumises à 14 500 g à 5° C pendant 30 mn. Le surnageant subit ensuite dans des conditions rigoureuses d'asepsie, une filtration stérilisante sous vide à travers un filtre Seitz.

Ce filtrat acellulaire est traité au sulfate d'ammonium jusqu'à 50 p. 100 de saturation, maintenu à 5° C pendant 1 h et centrifugé à 5° C pendant 30 mn et recueilli.

Le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium jusqu'à 75 p. 100 de saturation, le mélange maintenu à 5° C pendant une nuit et centrifugé à 30 000 g pendant 30 mn à 5° C.

Les deux culots de centrifugation sont alors dissous dans du tampon véronal 0,05 M pH 8 et la solution ainsi obtenue dialysée contre le même tampon à 5° C pendant une nuit.

Sur la solution enzymatique ainsi obtenue nous testons l'activité coagulante et protéolytique.

2.1.3. Mesure de l'activité coagulante : nous utilisons comme substrat, du lait écrémé reconstitué par dissolution de 12 g de « Skim-Milk Difco » dans 100 ml d'eau distillée stérile. Son pH est de 6,5.

Au moment d'effectuer le test, 5 ml de lait sont introduits dans un tube à essais de 160×16 mm stérile ; 0,25 ml d'une solution de CaCl_2 0,2 M est ajouté pour obtenir un lait dont la concentration en CaCl_2 est de l'ordre de 0,01 M ; 0,5 ml du filtrat acellulaire ou de la solution enzymatique est ensuite introduit et mélangé au substrat.

Placé à 30° C dans un bain-marie thermostaté, nous notons le temps mis pour obtenir le début de coagulation ; ce temps exprimé en minutes constitue la mesure de l'activité coagulante. Nous considérons comme unité enzyme (U.E.) la quantité d'enzyme contenue dans 0,5 ml de solution permettant la coagulation de 5 ml de lait (préparé dans les conditions décrites ci-dessus) à 30° C en 3 mn.

2.1.4. Mesure de l'activité protéolytique : la technique de Folin modifiée permet d'évaluer la concentration en tyrosine provenant de la dégradation de la caséine.

Nous utilisons comme substrat la caséine Hammarsten (Merck) à 1 p. 100 dans un tampon Tris-HCL 0,2 M pH 8,45.

5 ml de substrat additionnés de 0,5 ml d'une solution de CaCl_2 6.10^{-2} M sont soumis à l'action de 1 ml de solution enzymatique pendant 10 mn à 45° C. La réaction est ensuite stoppée par addition de 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique (T.C.A.) à 10 p. 100, et au bout de 10 mn une filtration sur papier Whatman n° 3 est effectuée.

2 ml de filtrat sont neutralisés par addition de 5 ml d'une solution de carbonate de sodium à 20 p. 100 et 1 ml de réactif de Folin dilué 3 fois ajouté. La coloration du mélange apparaît et nous la laissons se développer à température ambiante pendant 20 mn.

La densité optique (D.O.) est alors mesurée à 660 nm au spectrophotomètre Beckmann Acta II qui permet d'évaluer l'activité protéolytique par référence à la courbe étalon représentant la D.O. à 660 nm en fonction de la concentration en tyrosine évaluée en mg/ml (fig. 1).

2.2. Le système enzymatique coagulant et protéolytique

2.2.1. Conditions de production : nous déterminons les conditions optima de production de ce système enzymatique en choisissant de cultiver la souche sur le milieu de culture le plus favorable, à la température optima de croissance, pendant un temps requis pour obtenir une activité maxima.

2.2.1.1. Le milieu de culture : la mise en culture de notre souche sur différents milieux dans lequel l'apport en azote est constitué par

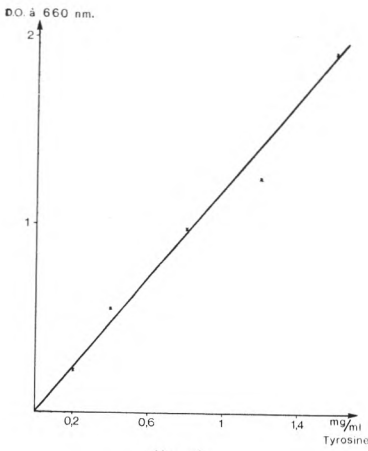


fig. 1

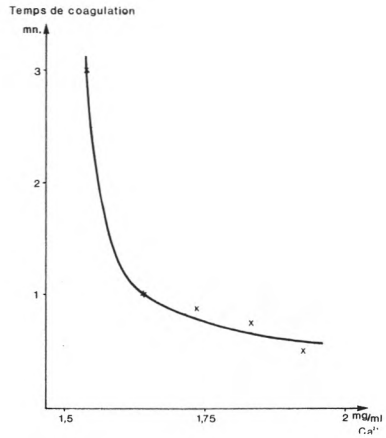


fig. 2

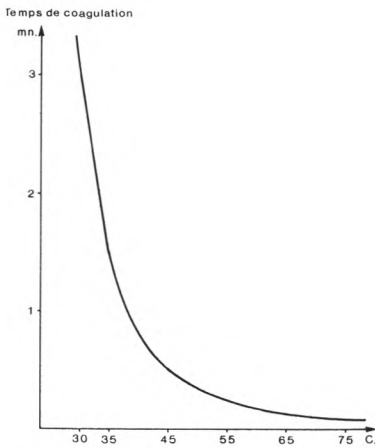


fig. 3

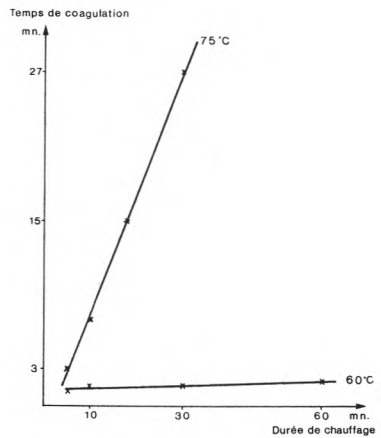


fig. 4

des peptones d'origine différente et par différents hydrolysats de caséine, nous amène à choisir la source d'azote la plus favorable à la production du système enzymatique le plus actif.

L'activité enzymatique en fonction de la source d'azote du milieu est testée sur le filtrat acellulaire par la mesure de l'activité coagulante. Nous savons en effet, d'après les résultats des études faites sur la propriété de coaguler le lait des enzymes d'origine microbienne et d'après nos propres observations, qu'il existe une relation certaine

TABLEAU 17. — Influence de la source d'azote

Milieu de culture		pH	pH du filtrat acellulaire	Activité coagulante (en mn)		
Source d'azote				30° C	45° C	65° C
1. Caséinate de calcium (Merck)		7	7,15	—	45	25
2. Bacto-casitone (Difco)		6,7	7,7	19	7	1
3. Bacto-soytone (Difco)		6,7	7,5	—	—	—
4. Trypticase (B.B.L.)		7	7,5	—	—	27
5. Polypeptone (B.B.L.)		7	8,5	17	4,30	1
6. Hydrolysate acide de caséine (Merck)		7	8,5	—	—	11
7. Casamino-acides (Difco)		6,7	7,5	—	—	—
8. Hydrolysate pancréatique de caséine (Merck)		7	8,6	—	—	30

Bacto-casitone = mélange de peptides obtenu par dégradation pancréatique de la caséine.

Bacto-soytone = peptone provenant de l'hydrolyse enzymatique de protéine de soja.

Trypticase = mélange de peptides obtenu par action de la trypsine sur la caséine.

Polypeptone = mélange de trypticase et de thiotone (peptone obtenu par action de la pepsine sur la viande).

Casamino-acides = hydrolysate acide de caséine.

TABLEAU 18. — Influence de la concentration en glucose

Milieu de culture			pH du filtrat acellulaire	Activité coagulante (en mn)	
Source d'azote	Concentration en glucose g p. 1000	pH		30° C	45° C
Bacto-casitone	0	6,7	7,7	19	7
	1		7,35	16	4
	5		6,85	16	3,30
Polypeptone	0	7	8,5	17	4,30
	1		8	15	3
	5		7,45	15	3

entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique de ces enzymes. C'est donc le test de coagulation que nous utilisons pour juger de l'activité des filtrats acellulaires avant de préparer l'extrait enzymatique.

Les milieux de culture sont obtenus par dissolution dans 1 000 ml d'eau distillée de 20 g de la source d'azote.

Les résultats de l'activité enzymatique en fonction de la source d'azote constituant le milieu de culture sont consignés dans le tableau 17 : la durée limite choisie du temps de coagulation est de 60 mn.

A la lumière des résultats obtenus, nous retenons les milieux 2 et 5, c'est-à-dire constitués de « Bactocasitone » ou de « Polypeptone ».

Nous nous sommes alors demandés si l'addition de glucose à la source azotée n'améliorerait pas la production du système enzymatique recherché. Nous effectuons donc des essais de culture de notre souche sur les milieux 2 et 5 dépourvus de glucose et additionnés de glucose aux concentrations de 1 et 5 p. 1000. Les cultures sont effectuées toujours dans les mêmes conditions et l'activité coagulante des filtrats acellulaires testée.

Le tableau 18 rend compte des résultats obtenus.

L'observation des résultats nous montre que l'addition de glucose améliore quelque peu la production du système enzymatique.

2.2.1.2. La température d'incubation : nous choisissons dans cette étude la température optima de croissance, déterminée lors de l'identification de nos souches, à savoir celle de 30° C.

2.2.1.3. Durée des cultures : l'influence du temps de culture est testée en cultivant la souche sur milieu à la Polypeptone et milieu au Bactocasitone glucosés à 1 p. 1000 pendant 24 h, 48 h, 72 h. L'activité enzymatique est déterminée sur les filtrats acellulaires par le test de coagulation dont les résultats sont consignés dans le tableau 19.

Les résultats fournis dans les tableaux 17, 18 et 19 correspondent à la moyenne d'une série de cinq essais qui ne présentent que de très faibles différences, non significatives.

Donc, nous cultivons *Aeromonas hydrophila* souche ELP 5 sur milieu à la polypeptone à 1 p. 1000 de glucose pendant 72 h à 30° C sans agitation (cinq essais de culture à 100 R.P.M. ayant donné une activité moindre du filtrat acellulaire).

2.2.2. L'extrait enzymatique : obtenu à partir de filtrats acellulaires de cultures d'*Aeromonas hydrophila* souche ELP 5, selon la technique énoncée pages 542 et 543, l'extrait enzymatique se trouve en solution dans un tampon véronal 0,05 M pH 8.

TABLEAU 19. — Influence de la durée des cultures

Milieu de culture	Temps de culture (h)	pH du filtrat	Activité coagulante (en mn)	
			30° C	45° C
Polypeptone glucosé à 1 p. 1000 pH 7	24	6,82	20	6
	48	7,72	18	5
	72	8,22	15	3
Bacto-casitone glucosé à 1 p. 1000 pH 6,7	24	6,67	32	11
	48	6,75	20	6
	72	7,65	16	4

2.2.2.1. Activité coagulante : nous rappelons que la mesure de l'activité coagulante est exprimée par le temps, en minutes, mis pour obtenir le début de coagulation dans des conditions définies.

2.2.2.1.1. Influence de la concentration en ions Ca^{++} : sachant que l'action coagulante de la présure est activée par l'addition de calcium au lait, nous étudions l'influence de la concentration en ions Ca^{++} du lait sur l'activité coagulante de notre extrait enzymatique.

Le lait utilisé pour le test de coagulation a une concentration initiale en Ca^{++} de 1,22 mg/ml (concentration déterminée au spectrophotomètre à émission de flamme Delta Jobin Yvon, modèle Kuhlmann) : des échantillons de lait additionnés de quantité croissante de Ca^{++} sont préparés et le test de coagulation effectué.

TABLEAU 20

Influence de la concentration en Ca^{++} sur l'activité coagulante

Concentration en ions Ca^{++} du lait (mg/ml)	Temps de coagulation (en mn et s) à 30° C
1,255	Pas de coagulation le lait est digéré en 30mn 3 mn 1 mn 45 s à 1 mn 45 s 30 s
1,35	
1,45	
1,54	
1,64	
1,735	
1,83	
1,925	

Les résultats donnés dans le tableau 20 et représentés graphiquement figure 2, montrent que la concentration minima en Ca^{++} nécessaire pour obtenir la coagulation est de 1,54 mg/ml et que l'addition de Ca^{++} diminue le temps de coagulation.

2.2.2.1.2. Influence de la température et stabilité thermique : le test de coagulation est réalisé à différentes températures et le temps au bout duquel le début de coagulation est observé est noté.

Le tableau 21 et la représentation graphique des résultats figure 3, nous montrent qu'à une élévation de la température correspond une augmentation de l'activité coagulante.

Pour étudier la stabilité thermique de l'activité coagulante nous effectuons deux séries d'essais.

TABLEAU 21

Influence de la température sur l'activité coagulante

Température (en ° C)	Temps de coagulation (en mn et s)
30	3 mn
35	1 mn 30 s
45	30 s
55	15 s
65	8 s
75	3 s

TABLEAU 22

Influence du temps de chauffage à 60° C et à 75° C sur l'activité coagulante

Durée du chauffage (en mn)	Chauffage à 60° C	Chauffage à 75° C
	Activité coagulante (en mn et s)	Activité coagulante à 30° C (en mn et s)
5	1 à 1,30	3
10	1,30	7
20	1,30	15
30	1,30 à 2	27
60	2	supérieur à 60

Dans la première série la température reste constante tandis que varie le temps de chauffage. L'extrait enzymatique est soumis aux températures de 60° C et 75° C pendant 5, 10, 20, 30 mn et 1 h et le test de coagulation effectué.

Les résultats consignés dans le tableau 22 et leur représentation graphique figure 4, font ressortir qu'un chauffage à 60° C pendant 1 h n'inhibe pas l'activité coagulante ; par contre, l'activité coagulante diminue de façon appréciable avec l'augmentation de la durée du chauffage à 75° C pour être nulle après 60 mn de chauffage à 75° C.

Dans une deuxième série d'essais l'extrait enzymatique est porté à différentes températures pendant 15 mn et l'activité coagulante testée.

Le tableau 23 et la figure 5 qui rendent compte des résultats font ressortir une diminution de l'activité coagulante en fonction de la température de chauffage pendant un temps donné, cette activité étant totalement inhibée par un chauffage de 15 mn à 80° C.

2.2.2.1.3. Influence du pH sur l'activité coagulante : l'extrait enzymatique est porté à différentes valeurs de pH et ramené ensuite à pH 8 pour effectuer le test de coagulation. Les pH basiques de 9 et 11 sont obtenus avec NaOH N/10. Les pH acides de 2 et 5 avec HCl N/10. Nous rappelons que le pH initial de l'extrait enzymatique en tampon véronal est de 8.

TABLEAU 23

Influence du chauffage pendant un temps donné à différentes températures

Températures de chauffage en ° C	Temps de chauffage 15 mn	Activité coagulante à 30° C (en mn)
	70	3
75	7	
80	supérieur à 60	

TABLEAU 24. — Influence du pH sur l'activité coagulante

Valeur du pH	Activité coagulante à 30° C (en mn)
2	plus de 60
5	12
8	3
9	3
11	3

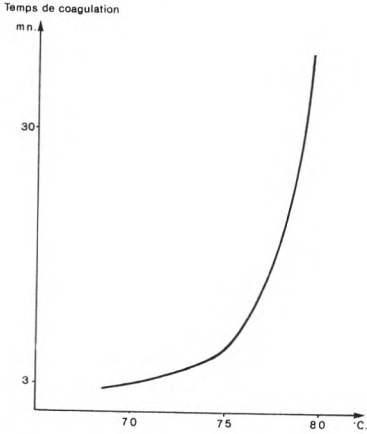


fig. 5

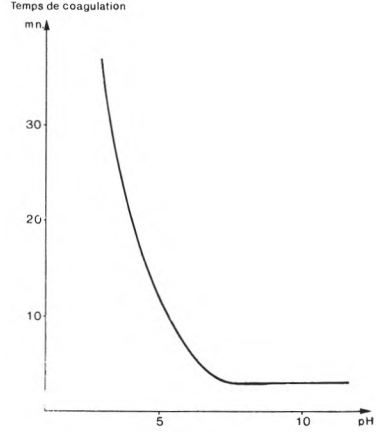


fig. 6

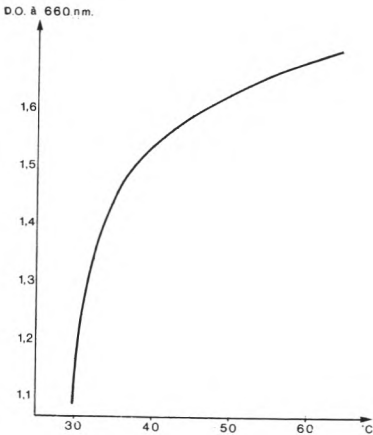


fig. 7

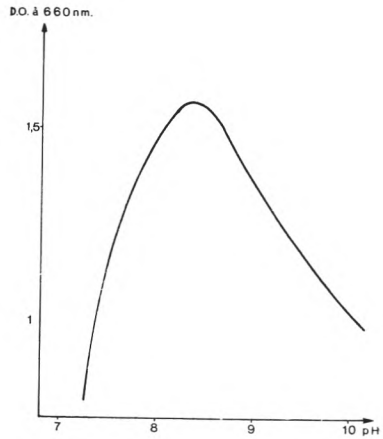


fig. 8

Le tableau 24 et la figure 6 qui représentent les résultats obtenus montrent la stabilité de l'activité coagulante aux pH basiques tandis que nous observons une inhibition aux pH acides.

2.2.2.2. Activité protéolytique : l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique exprimée par la D.O. à 660 nm est de 1,548, ce qui correspond à une concentration de 1,25 mg/ml en tyrosine.

2.2.2.2.1. Influence de la température : l'activité protéolytique est testée à 30° C, 40° C, 50° C et 60° C pendant 10 mn. Le tableau 25 et la figure 7 qui donnent les résultats obtenus montrent qu'à une

TABLEAU 25
Influence de la température sur l'activité protéolytique

Température en ° C	Activité protéolytique	
	D.O. à 660 nm	mg/ml en tyrosine
30	1,115	0,94
40	1,535	1,29
50	1,625	1,37
60	1,682	1,42

TABLEAU 26. — Influence du pH sur l'activité protéolytique

	Activité protéolytique	
	D.O. 660 nm	mg/ml en tyrosine
7,3	0,868	0,73
7,7	1,325	1,11
8,2	1,545	1,30
8,4	1,567	1,32
8,6	1,529	1,29
9,1	1,321	1,12
10	1,026	0,86

élévation de la température correspond une augmentation de l'activité protéolytique.

2.2.2.2. Influence du pH : pour déterminer quelle peut être l'influence du pH sur l'activité protéolytique, nous effectuons le test de protéolyse sur la caséine Hammarsten en solution à différents pH.

La caséine est portée à un pH de 7,3 à 8,6 en tampon Tris-HCl 0,2 M et à un pH de 9,1 et 10 en tampon carbonate-bicarbonate 0,2 M.

Le tableau 26 et la figure 8 montrent qu'à un pH inférieur à 8 ou supérieur à 8,4 l'activité protéolytique diminue. C'est donc aux environs de pH 8,2-8,4 que l'activité protéolytique est maxima.

Nous venons de confirmer, par l'étude encore sommaire de son système enzymatique coagulant et protéolytique, qu'*Aeromonas hydrophila* ELP 5 est une bactérie caséolytique, mais cette action caséolytique est limitée en fonction de la température et du pH.

(à suivre)