

Article de recherche

Influence de plusieurs facteurs sur l'autolyse de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414

S. Lortal¹, P. Boyaval¹ et J. Van Heijenoort²

¹ INRA, Laboratoire de recherches de technologie laitière, 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex;

² CNRS, Laboratoire de biochimie moléculaire et cellulaire, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

(reçu le 31 août 1988, accepté le 28 novembre 1988)

Résumé — L'autolyse des bactéries lactiques libère au cours de l'affinage des enzymes intracellulaires qui vont activement participer à la maturation des fromages. *Lactobacillus helveticus* en particulier intervient ainsi largement dans la flaveur finale des fromages à pâte pressée cuite. L'influence de la température, du pH, du magnésium, et du stade de croissance sur l'autolyse induite par choc osmotique de *L. helveticus* CNRZ 414 est envisagée dans ce travail. L'autolyse procède par une cinétique biphasique. Un relargage concomitant de matériel absorbant, à 260 nm et à 280 nm, est observé. La présence d'inhibiteurs de protéases dans le milieu favorise l'autolyse. La température optimale pour l'autolyse de cette souche se situe entre 40 et 45 °C. Au-delà de 45 °C, le système est inhibé. Les cellules récoltées en début de phase exponentielle s'autolysent de manière plus marquée que pour les autres stades de croissance. Enfin, l'effet du magnésium sur l'autolyse dépend de sa concentration.

autolyse — *Lactobacillus helveticus* — pari

Summary — Autolysis of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414 : influence of some factors. Lactic acid bacteria autolysis plays an important role in cheese ripening. As a matter of fact, proteolytic enzymes are released in the curd when cell envelopes have been broken by their own autolysins. *Lactobacillus helveticus* is implicated in hard cooked cheese ripening. The effect of temperature, pH, magnesium, and growth phase on *L. helveticus* CNRZ 414 autolysis are presented in this paper. If the effect of pH was rather complicated to explain without extensive complementary experiments, temperature dependency looked like an enzymatic degradation. Accompanying release of material absorbing at 260 and 280 nm was observed. Protease inhibitors were favorable to autolysin expression. Early harvested cells at the beginning of the exponential phase of growth autolysed much more rapidly than at later growth phases. The effect of magnesium depends on its concentration.

autolysis — *Lactobacillus helveticus* — cell wall

Introduction

Spontanée ou induite, l'autolyse se caractérise par une rupture de l'enveloppe bactérienne (membrane et paroi) avec libération du contenu cytoplasmique. Ce phénomène, observé chez de nombreuses espèces bactériennes, a été principalement étudié chez *E. coli* (Leduc et Van Heijenoort, 1980; Leduc *et al.*, 1982), *Bacillus subtilis* (Young *et al.*, 1974; Takahara *et al.*, 1964) et *Streptococcus faecalis* (Shockman *et al.*, 1967). Il est maintenant établi que les bactéries possèdent des enzymes capables de rompre des liaisons de leur propre paroi, entraînant ainsi la lyse. Ces enzymes sont appelées de par cette particularité «autolysines» et certaines ont déjà été isolées et purifiées (Rogers *et al.*, 1984). Leur rôle, toutefois, ne se limite pas à l'autolyse; elles interviendraient de façon essentielle dans la croissance cellulaire (en réalisant les coupures permettant l'insertion de nouveau matériel pariétal), dans la division cellulaire, les phénomènes de transformation et de sporulation (Rogers *et al.*, 1980).

Leur étude chez les bactéries lactiques présente à terme au moins deux applications intéressantes :

- la première concerne l'affinage des fromages. Protéases et peptidases bactériennes y jouent, on le sait, un rôle essentiel (Desmazeaud et Gripon, 1977). Or ces enzymes ne sont en général mises au contact de leur substrat qu'au moment de l'autolyse. Connaître les facteurs qui contrôlent ou influencent celle-ci permettrait de libérer à un stade choisi ce contenu cytoplasmique à haut potentiel protéolytique et, en conséquence, d'accélérer l'affinage;
- la deuxième concerne les nombreuses fermentations où les bactéries lactiques interviennent et où l'autolyse, par destruction de l'agent fermenteur, peut devenir préjudiciable. Mieux

connaître ses déterminants permettrait de l'éviter ou de la contrôler.

Les recherches réalisées à ce jour sur l'autolyse des bactéries lactiques relèvent de deux approches différentes et complémentaires : d'une part des études biochimiques approfondies sur la localisation, la spécificité, le relargage et l'isolement de ces autolysines (Coyette et Ghuyssen, 1970; Coyette et Shockman, 1973; Higgins *et al.*, 1973; Mou *et al.*, 1976); d'autre part des études plus technologiques sur l'autolyse dans des conditions proches de celles de l'affinage des fromages (Ohmiya et Sato, 1969a et b; Bie et Sjöstrom, 1975a et b).

L'espèce *Lactobacillus helveticus* intervient dans la fabrication de nombreux fromages à pâte pressée cuite. Son pouvoir acidifiant est remarquable (jusqu'à 2,8% p/v d'acide lactique, Veisseyre, 1975) et ses propriétés protéolytiques affirmées (El Soda et Desmazeaud, 1982). Malgré la très grande importance de cette espèce en transformation fromagère, son système autolytique n'a été que peu étudié (Ohmiya et Sato, 1969a et b; Bie et Sjöstrom, 1975a et b). Nous présentons dans ce travail l'influence de plusieurs facteurs (température, pH, stade de croissance, présence d'inhibiteurs de protéases ou de magnésium) sur l'autolyse de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414.

Matériel et Méthodes

Cultures bactériennes

La souche utilisée provenait de l'INRA (Centre de recherche de Jouy-en-Josas, France) et porte le n° CNRZ 414.

Son appartenance à l'espèce *Lactobacillus helveticus* a été confirmée par galerie API (France). Elle était conservée congelée (-30 °C) dans du MRS (DIFCO) (De Man *et al.*, 1960) additionné de 15% de glycérol. La

souche avant utilisation était repiquée deux fois en bouillon MRS (ensemencement 1% v/v) et incubée à 45 °C durant 15 h. Les cultures étaient effectuées dans du MRS, à 45 °C, sans régulation de pH.

Induction de l'autolyse

Principe

L'autolyse a été induite par choc osmotique sur des cellules récoltées. Le culot cellulaire obtenu par centrifugation est resuspendu dans un tampon de pH et concentration connus, et ayant une pression osmotique toujours inférieure à la pression osmotique intracellulaire (comprise chez les bactéries à Gram positif entre 10 et 20 atm).

Sauf exception indiquée dans le texte, les cellules étaient séparées dans le premier tiers de la phase exponentielle (poids sec cellulaire de 0,8 mg/ml) par centrifugation (24 000 g x 10 min, 4 °C), le surnageant étant éliminé le plus complètement possible en essuyant soigneusement les parois du tube. Le culot était rapidement resuspendu dans un volume de tampon tel que le poids sec cellulaire soit de 0,33 mg/ml environ. Cette suspension était ensuite placée à la température à laquelle on souhaitait observer l'autolyse.

Tamppons utilisés

La totalité des tamppons utilisés ont été préparés à partir de produits Merck et d'eau distillée.

Nature des tamppons en fonction du pH (avant stérilisation) :

pH = 5,00 à pH = 5,50... Tampon acétate de sodium 0,2 M

pH = 6,00 à pH = 8,00... Tampon phosphate de sodium 0,1 ou 0,2 M

pH = 8,50 à pH = 9,50... Tampon Tris ajusté avec HCl 0,2 M

Suivi de l'autolyse

Décroissance de la densité optique (à 650 nm)

L'évolution de l'absorbance à 650 nm au cours de la lyse était suivie par spectrophotométrie (spectrophotomètre Beckman acta M IV).

Relargage d'acides nucléiques et de protéines

Au cours de l'autolyse, une partie du contenu cytoplasmique est relarguée dans le tampon de lyse. Pour suivre ce phénomène, des échantillons (3 ml) étaient prélevés à différents temps, filtrés (filtres HAWP Millipore 0,45 µm) et les variations de la densité optique à 260 nm (acides nucléiques) et 280 nm (protéines) étaient mesurées.

Chute de la viabilité

Des échantillons étaient prélevés à différents temps d'autolyse, ensemencés dans un milieu MRS gélosé (en double) et les colonies étaient dénombrées après 48 h à 45 °C, en conditions anaérobies.

Autolyse en présence d'inhibiteurs de protéases

L'EDTA (Titrplex II) (Merck), l'inhibiteur de trypsine (provenant du soja) (Sigma), la pepstatine A (inhibiteur de pepsine) (Sigma) étaient ajoutés au tampon de lyse à des concentrations finales de 0,1 mM pour l'EDTA et 0,01 mM pour les autres inhibiteurs.

Observations microscopiques

Elles étaient réalisées en contraste de phase avec un microscope Nikon Optiphot (objectif à immersion, G = 1 000).

Autolyse en présence de magnésium

Du chlorure de magnésium (Merck) était ajouté dans le tampon de lyse (tampon phosphate de sodium, 0,1 M, pH = 7,00), de telle sorte que les concentrations finales en magnésium soient de 10^{-2} M et 10^{-3} M.

Résultats

Éléments concernant la souche utilisée

A l'observation microscopique, les cellules de *L. helveticus* CNRZ 414 se présentaient sous forme de bâtonnets seuls ou

assemblés en courtes chaînes. A 45 °C, le taux de croissance de *L. helveticus* CNRZ 414 était de 0,8 h⁻¹. Le poids sec bactérien était de 0,37 mg/ml de milieu de DO égale à 1.

Mise en évidence de l'autolyse de *L. helveticus* CNRZ 414

Pour cette phase de mise en évidence du phénomène, les cellules étaient resuspendues dans un tampon phosphate de sodium, de concentration 0,2 M, et de pH égal à 8 (avant stérilisation).

Suivi de la DO à 650 nm, 260 nm et 280 nm

Les densités optiques en visible et en ultra-violet évoluaient différemment au

cours de l'autolyse. La rupture de l'enveloppe bactérienne entraîne une diminution de la DO à 650 nm et une augmentation à 260 et 280 nm, par libération du contenu cytoplasmique (acides nucléiques et protéines) (Fig. 1).

La chute de la DO (650 nm) était surtout importante dans les 8 premières heures (diminution de 50% par rapport à la DO initiale). Au-delà, on observe un seuil en dessous duquel la DO ne descend plus, même après plusieurs jours (résultats non présentés).

Evolution de la viabilité

Après un temps de latence (30—40 min), la viabilité chute exponentiellement. Après 5 h en tampon d'autolyse on ne dénombre plus aucune bactérie vivante (Fig. 2).

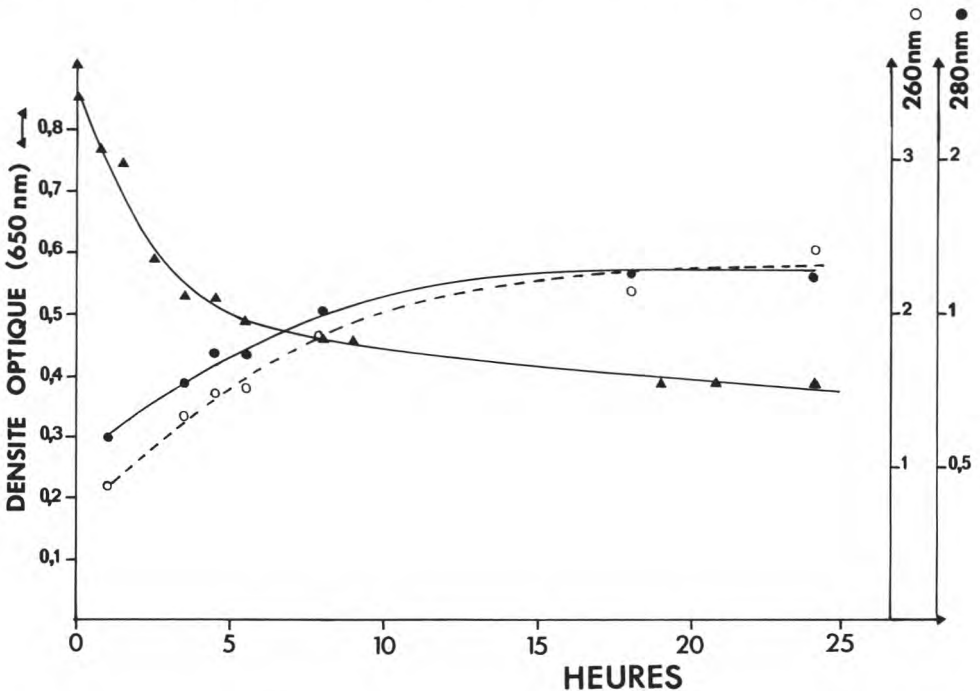


Fig. 1. Autolyse (▲) des cellules de *L. helveticus* placées en tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 8), avec libération de protéines (●) et d'acides nucléiques (○).

Observation microscopique

Au cours de l'autolyse, les bâtonnets de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414 devenaient plus clairs et granuleux (aspect probablement dû à une recondensation intracytoplasmique d'ADN). Des «fantômes» (parois seules ayant gardé la forme de la cellule) apparaissaient. Des déformations et une tendance à l'agglutination étaient fréquemment observées. Ces symptômes affectaient une fraction de la population cellulaire, certains bâtonnets avaient un aspect absolument normal même après un séjour de 10 h dans le tampon d'autolyse.

Recherche des conditions optimales d'autolyse

Influence de la température

Les essais étaient réalisés dans du tampon phosphate de sodium 0,2 M, à pH 8,0; la température d'autolyse variant de 30 à 60 °C, de 5° C en 5° C. La Figure 3 montre la diminution de la DO (en %) en 24 h, selon la température. La température optimale de lyse semble se situer entre 40 et 45 °C. On observe une inactivation

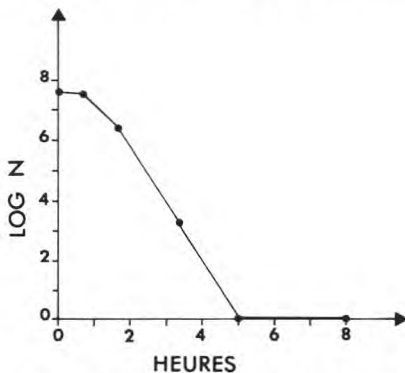


Fig. 2. Evolution de la viabilité lors de l'autolyse de *L. helveticus*. Conditions identiques à la Fig. 1. N est le nombre de cellules viables mesuré par étalement en double sur gélose MRS.

du système autolytique après 30 min à 60 °C.

Influence du pH

Dans la zone optimale de température précédemment définie (soit 42 °C), plusieurs tampons de concentration 0,2 M et de pH différents étaient utilisés. Le pourcentage de diminution de DO (650 nm) par rapport à la DO initiale était mesuré pour chaque pH après 1 h 30, 3 h 30, et 8 h d'autolyse (Fig. 4).

Bien que la courbe apparaisse difficilement interprétable, une zone de pH favorable à l'autolyse apparaît entre pH 6,50 et pH 8,00. Cette expérience est toutefois peu répétable. A pH acides notamment (pH = 4,50 et pH = 5,00), on obtenait, contrairement à la Fig. 1, des pourcentages de diminution de DO très bas.

La courbe à 8 h n'est pas représentée car on observe alors un aplanissement des différences entre les pH.

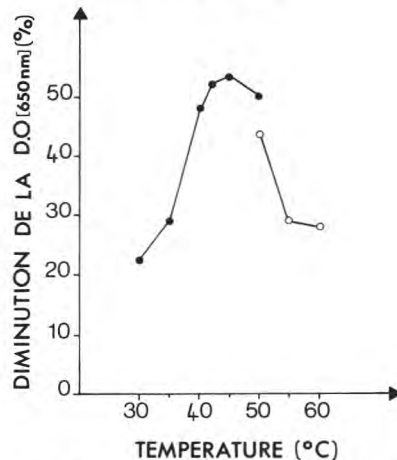


Fig. 3. Influence de la température sur l'autolyse de *L. helveticus*. Conditions identiques à la Fig. 1. Les diminutions de DO représentées étaient obtenues après 24 h d'autolyse. Les sigles ● et ○ représentent deux expérimentations différentes.

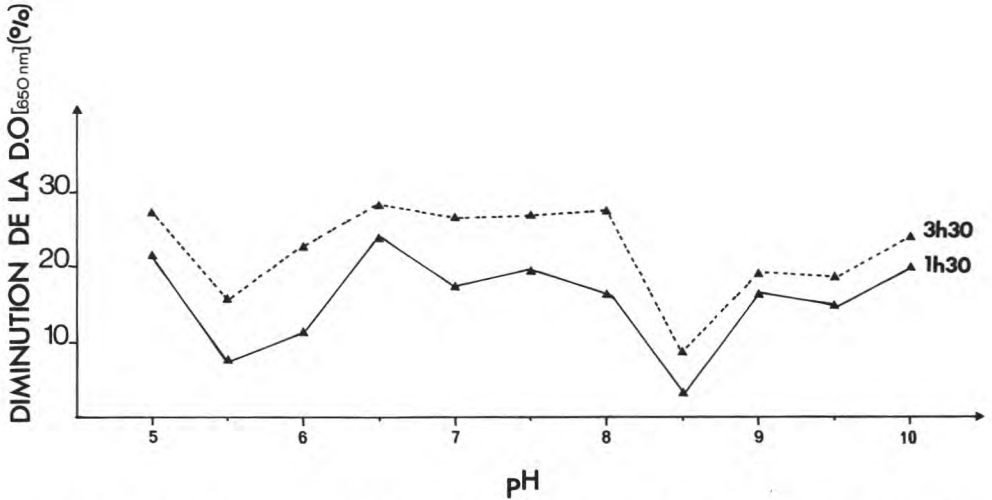


Fig. 4. Diminution de la densité optique dans le tampon de lyse en fonction du pH, en 1 h 30 (—) et 3 h 30 (---).

Influence du stade de croissance

Pour étudier l'influence du stade de croissance sur l'autolyse, les cellules étaient récoltées en début (DO = 0,90), au milieu (DO = 3,40) et en fin de phase exponentielle (DO = 4,90). Les résultats montrent que plus la culture est récoltée tôt après le début de la phase exponentielle, plus son autolyse est importante (Fig. 5). En pourcentage de diminution de DO, on obtenait respectivement pour ces trois stades de croissance différents : 50,3%, 44,2% et 30,7% en 24 h.

Présence d'EDTA et d'inhibiteurs de protéases dans le milieu d'autolyse

L'autolyse obtenue en présence d'EDTA, d'inhibiteur de trypsine et d'inhibiteur de pepsine était de manière significative supérieure à celle obtenue dans du tampon seul (*cf.* Fig. 6). (Dans la Figure 6, l'autolyse obtenue en présence de pepsatine A n'est pas représentée, car elle est en tout point semblable à celle obtenue avec l'inhibiteur de trypsine).

Présence de magnésium dans le milieu d'autolyse

Un net ralentissement de l'autolyse est observé en présence de $MgCl_2 \cdot 10^{-2}$ M. En revanche, à 10^{-3} M, le magnésium semble améliorer légèrement le phéno-

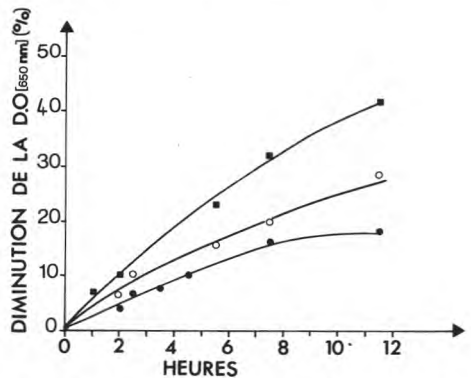


Fig. 5. Influence du stade de croissance sur l'autolyse de *L. helveticus* en tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 8,00). Récolte des cellules à DO = 0,90 (■), DO = 3,40 (○) et DO = 4,90 (●).

mène autolytique (cf. Fig. 7). Un résultat comparable a été obtenu chez une autre souche, *L. helveticus* ATCC 12046.

Discussion

L'induction par choc osmotique de l'autolyse de *Lactobacillus helveticus* a été réalisée pour la première fois. La cinétique de lyse, suivie par l'évolution de la DO à 650 nm, est rapide dans les cinq premières heures, puis beaucoup plus lente. L'absence de phase de latence avant la diminution de la densité optique à 650 nm est semblable à ce qu'on observe chez *L. fermenti* (Neujahr et Logardt, 1973) et *S. cremoris* (Mou *et al.*, 1976), mais diffère des résultats obtenus chez *L. acidophilus* (Coyette et Shockman, 1973). L'existence d'un seuil, après quelques heures d'autolyse, au-delà duquel la densité optique résiduelle encore élevée ne chute plus que très lentement, a déjà été observée chez *S. cremoris* (Mou *et al.*, 1976). Ces derniers auteurs n'émettent pas d'hypo-

thèses particulières pour expliquer ce ralentissement.

L'amélioration nette de l'autolyse obtenue en présence d'inhibiteurs de protéases suggère que des protéases de *L. helveticus* ont la possibilité de dégrader les enzymes autolytiques et ainsi de ralentir l'autolyse. L'EDTA peut, outre son action d'inhibiteur des protéases, agir en séquestrant des cations éventuellement inhibiteurs des autolysines, d'où une lyse plus importante.

L'augmentation de la densité optique à 260 nm et 280 nm dans le surnageant d'autolyse témoigne d'un relargage progressif de matériel cytoplasmique. Elle ne constitue toutefois qu'une approche qualitative, et l'utilisation d'un marqueur de lyse (qui pourrait être pour cette espèce la lactate deshydrogénase, enzyme intracellulaire) est indispensable à la quantification de ce relargage.

A l'observation microscopique, certains bâtonnets apparaissent absolument normaux même après plusieurs heures en tampon d'autolyse. Or la viabilité est alors

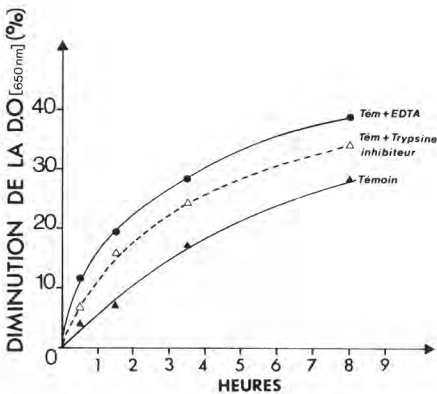


Fig. 6. Autolyse de *L. helveticus* en présence d'inhibiteurs de protéases : témoin = tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH = 6,50 (▲); témoin + EDTA 0,1 mM (●); témoin + inhibiteur de trypsine 0,01 mM (△).

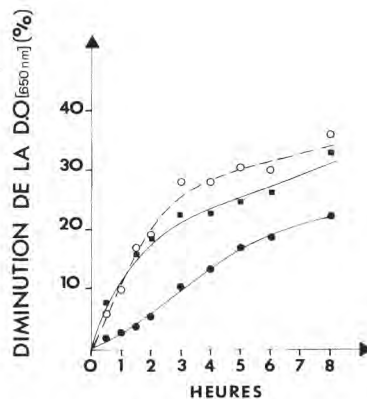


Fig. 7. Autolyse de *L. helveticus* en présence de $MgCl_2$: témoin = tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH = 7,00 (■); témoin + $MgCl_2$ 10^{-2} M (●); témoin + $MgCl_2$ 10^{-3} M (○).

nulle. Ce phénomène concorde avec des observations faites chez des streptocoques du groupe N (Krishna et Dutta, 1976; Langsrud *et al.*, 1978; Langsrud *et al.*, 1987).

Dans le même sens, si l'on compare l'évolution de la viabilité et celle de la densité optique (650 nm), on observe qu'après un séjour de 5 h en tampons, plus de 50% de la densité optique initiale subsiste alors qu'on ne dénombre plus aucune bactérie viable; la mort des cellules survient donc sans lyse totale de leurs structures.

Plusieurs paramètres d'environnement influent largement sur l'autolyse. Lorsqu'on augmente la température, la vitesse initiale du phénomène augmente, mais l'inhibition intervient de plus en plus tôt, ce qui est conforme à l'action de la température sur tout système enzymatique. L'optimum de température se situe entre 42 et 45 °C, c'est-à-dire semblable à l'optimum de croissance. (Ce résultat diffère légèrement de ceux obtenus chez *L. fermenti* par Neujahr et Logardt (1973), où l'optimum de température pour l'autolyse était supérieur à l'optimum de croissance.)

La zone favorable de pH obtenue, trop imprécise (entre pH = 6,50 et pH = 8,00), ne permet pas d'émettre d'hypothèses concernant la spécificité de ou des autolysines présentes. De plus, le manque de répétabilité concernant l'influence du pH suggère que le critère utilisé (diminution de la densité optique à 650 nm) n'est pas totalement adapté pour appréhender l'effet de ce paramètre.

L'effet inhibiteur du magnésium a déjà été observé chez d'autres espèces bactériennes (Leduc *et al.*, 1982; Neujahr et Logardt, 1973). En revanche, son action éventuellement activatrice à d'autres concentrations constitue un résultat nouveau.

Le choix du stade de croissance au moment de la récolte des cellules a une grande influence sur l'autolyse. Les cellules récoltées en fin de phase exponentielle ont une activité autolytique moins importante. Cette observation, déjà faite chez *L. fermenti* (Neujahr et Logardt, 1973), soutient l'hypothèse de l'implication des autolysines dans la croissance cellulaire et les phénomènes de division (Rogers *et al.*, 1980). Il apparaît en effet logique que l'activité autolytique soit plus forte quand la fréquence de division est plus importante, c'est-à-dire pendant la phase exponentielle. Toutefois, des mutants autolytiques déficients ont été isolés chez d'autres espèces (Fein et Rogers, 1976) et présentent une croissance et une division normales. D'autres, en revanche, voient ces phénomènes perturbés si l'activité autolytique est déficiente (Shungu *et al.*, 1979). L'isolement de mutants autolytiques déficients de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414 apporterait d'intéressants compléments à l'influence du stade de croissance que nous avons observée.

Le caractère complexe de l'influence du pH comme le manque d'informations sur la nature des composés cytoplasmiques et pariétaux relargués pendant la lyse cellulaire ne permettent pas actuellement de prédire l'autolyse dans un fromage ou dans un fermenteur. Pour cela, une approche plus biochimique du phénomène devient nécessaire. L'isolement d'autolysines (après relargage à partir de parois actives), l'étude de leur spécificité (par la nature des groupements pariétaux qu'elles libèrent), et l'éventuelle localisation de leur action (par microscopie électronique) constituent entre autres des éléments de connaissance indispensables à la compréhension du phénomène autolytique chez cette espèce bactérienne.

Références

- Bie R. & Sjoström G. (1975a) Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part. I. Material and Methods. *Milchwissenschaft* 30, 653-657
- Bie R. & Sjoström G. (1975b) Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part. II. Experiments with fluid substrates and cheese. *Milchwissenschaft* 30, 739-747
- Coyette J. & Ghuyssen J.M. (1970) Wall autolysis of *Lactobacillus acidophilus* strain 63 AM. *Biochemistry* 9, 2952-2955
- Coyette J. & Shockman G.D. (1973) Some properties of the autolytic N-acetylmuramidase of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 114, 34-41
- De Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135
- Desmazeaud M.J. & Gripon J.C. (1977) General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft* 32, 731-734
- El Soda M. & Desmazeaud M.J. (1982) Les peptides hydrolases des lactobacilles du groupe thermobactérien. I. Mise en évidence de ces activités chez *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1181-1188
- Fein J.E. & Rogers H.J. (1976) Autolytic enzyme deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 127, 1427-1442
- Higgins M.L., Coyette J. & Shockman G.D. (1973) Sites of cellular autolysis in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 116, 1375-1382
- Krishna B.M. & Dutta S.M. (1976) Studies on the autolytic changes in *S. cremoris* under starvation conditions. *Milchwissenschaft* 31, 741-744
- Langsrud P., Castberg H.B. & Landaas A. (1978) Propriétés autolytiques de quelques streptocoques de levain. 20^e Congr. Int. Lait 516-527
- Langsrud P., Landaas A. & Castberg H.B. (1987) Autolytic properties of different strains of group N *Streptococci*. *Milchwissenschaft* 42, 556-560
- Leduc M. & Van Heijenoort J. (1980) Autolysis of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 142, 52-59
- Leduc M., Kasra K.R. & Van Heijenoort J. (1982) Induction and control of the autolytic system of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 152, 26-34
- Mou L., Sullivan J.J. & Jago G.R. (1976) Autolysis of *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Res.* 43, 275-282
- Neujahr H.Y. & Logardt I.M. (1973) Autolytic enzyme system from *L. fermenti*. *Biochemistry* 12, 2578-2583
- Ohmiya K. & Sato Y. (1969a) Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part IX. Autolysis and proteolytic of *S. cremoris* and *L. helveticus*. *Agric. Biol. Chem.* 33, 1628-1635
- Ohmiya K. & Sato Y. (1969b) Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part X. Autolysis of lactic acid bacteria cells in aseptic rennet curd. *Agric. Biol. Chem.* 34, 457-463
- Rogers H.J., Perkins H.R. & Ward J.B. (1980) *Microbial Cell Walls and Membranes*. Chapman & Hall
- Rogers H.J., Taylor C., Rayters S. & Ward J.B. (1984) Purification and properties of autolytic endo-B N-acetylglucosaminidase and the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 2395-2402
- Shockman G.D., Pooley H.M. & Thompson J.S. (1967) Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 94, 1525-1530
- Shungu D.L., Cornett J.B. & Shockman G.D. (1979) Morphological and physiological study of autolytic-defective *Streptococcus faecalis* strains. *J. Bacteriol.* 138, 598-608
- Takahara Y., Machigaki E. & Mureo S. (1964) General properties of endo-N-acetylmuramidase of *Bacillus subtilis*, YT 25. *Agric. Biol. Chem.* 38, 2357-2365
- Veisseyre (1975) *Technologie du Lait*. 3^e ed., La Maison Rustique, Paris
- Young F., Tipper D. & Strominger J.L. (1974) General properties of endo-N-acetylmuramidase of *Bacillus subtilis* T25. *Agric. Biol. Chem.* 38, 2357-2365