NADIA THIVIERGE

Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* pour le développement de ferments mésophiles à aptitudes fromagères élevées (Cheddar)

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Département des aliments et de nutrition
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL

MARS 1999

© Nadia Thivierge 1999

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-42023-X

Canada

RÉSUMÉ

Les souches de treize ferments lactiques mésophiles ont été isolées, caractérisées et évaluées pour leurs activités autolytiques, protéolytiques et aminopeptidasiques. Au niveau de l'autolyse, les meilleures souches ont montré une autolyse de 40 % en moins de 3.0 h. L'activité protéolytique a été évaluée sur un lait non fermenté, à l'aide de la méthode de l'agar au lait et sur un lait fermenté avec les méthodes de l'OPA et du SDS-PAGE. À l'aide du SDS-PAGE, 21 souches ont été classées de type P_I et 5 souches de type P_{III}. L'activité aminopeptidasique a été déterminée à l'aide des substrats leucine-paranitroanilide (Leu-pNa) et glutamyl-paranitroanilide (Glu-pNa). Les souches testées possèdent une activité environ dix fois plus élevée pour la Pep N que pour la Pep A. La mesure de la résistance aux phages a également été évaluée et on obtient 15 souches résistantes et 10 souches sensibles. À l'aide des résultats obtenus aux différents test, un modèle prédictif a été proposé et trois nouveaux ferments ont été reconstitués.

TABLE DES MATIÈRES

Page

RÉSUMÉ i

TABLE DES MATIÈRES ii

LISTE DES TABLEAUX v

LISTE DES FIGURES vi

INTRODUCTION vii

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les lactocoques 1

1.2 Composition protéique du lait 1

1.3 Les caséines 3

1.3.1 La caséine αs1 3

1.3.2 La caséine αs2 4

1.3.3 La caséine β 4

1.3.4 La caséine κ 4

1.4 La micelle de caséine 5

1.5 Les protéines du lactosérum 5

1.5.1 L'α-lactalbumine 6

1.5.2 La β-lactoglobuline 6

1.6 La maturation du fromage 6

Page

1.7 Les agents protéolytiques du fromage 9

1.7.1 Enzymes coagulantes 10

1.7.2 Protéinases indigènes du lait 13

1.7.3 Enzymes protéolytiques des lactocoques 13

1.7.3.1 Utilisation des acides aminés 14

1.7.3.2 Utilisation des peptides 14

1.8 L'autolyse 24

1.8.1 Impact de l'autolyse sur la maturation 24

CHAPITRE II CARACTÉRISATION DES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUE ET AUTOLYTIQUE DE SOUCHES DE *LACTOCOCCUS LACTIS SSP CREMORIS* UTILISÉES EN PRODUCTION FROMAGÈRE.

RÉSUMÉ 28

2.1 INTRODUCTION 29

2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES 31

2.2.1 Les souches bactériennes 31

2.2.2 Conditions de culture 31

2.2.3 Activité protéolytique 32

2.2.3.1 SDS-PAGE 32

2.2.3.2 OPA (*o*-phtaldialdéhyde) 32

2.2.3.3 Agar au lait 33

2.3 Détermination de l'activité autolytique 34

2.4 Activité aminopeptidasique 34

2.5 RÉSULTATS 36

2.5.1 Activité protéinasique 36

2.5.2 Activité autolytique 46

Page

2.5.3 Activité aminopeptidasique 51

2.5.4 Résistance aux phages 55

2.5.5 Reconstitution de nouveaux ferments 57

2.5.6 Élaboration d'un modèle prédictif 60

DISCUSSION 66

RÉFÉRENCES 70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau **Page**

1. Concentration des différentes protéines du lait 2

2. Les enzymes de substitution 12

3. Spécificité des protéases de paroi de *Lactococcus lactis* 18

4. Peptidases de *Lactococcus lactis* 23

5. Activité protéinasique telle que déterminée par la méthode de l'agar au lait 38

6. Activité protéinasique telle que déterminée par la méthode de l'OPA après fermentation d'un lait à 6 % pour la détermination de l'activité protéinasique 39

7. Détermination de l'activité protéinasique par la mesure du pourcentage d'hydrolyse des protéines du lait à partir d'une électrophorèse sur SDS-PAGE 44

8. Détermination de l'activité autolytique en fonction du temps d'incubation 50

9. Mesure de l'activité de l'aminopeptidase N à l'aide d'un substrat chromogène : la leucine-pNa 52

10. Mesure de l'activité aminopeptidasique à l'aide du substrat Glu-pNa..... 54

11. Profil de résistance aux phages pour les différentes souches composant les treize ferments étudiés 56

12. Résumé des valeurs accordées pour chaque activité en vue de la construction d'un modèle prédictif 62

13. Valeurs obtenues par les souches pour la construction d'un modèle prédictif servant à reconstituer de nouveaux ferments 63

LISTE DES FIGURES

Figure **Page**

1. La synthèse de la chymosine 7
2. Système protéolytique des lactocoques 16
3. Représentation d'une chaîne peptidique et classification des peptidases. (1) Endopeptidase, (2) Aminopeptidase, (3) Carboxypeptidase 21
4. Exemple d'un résultat obtenu par la méthode de l'agar au lait pour la détermination de l'activité protéinasique. Souche NP49-15, peu protéinasique 37
5. Gel SDS-PAGE montrant le profil des protéines du lait avant et après fermentation. PA48-6 avant (ligne 1), PA48-6 après (ligne 2), PA48-25 avant (ligne 3), PA48-25 après (ligne 4), PJ201 avant (ligne 5), PJ201 après (ligne 6), PJ302-7 avant (ligne 7) et PJ302-7 après (ligne 8) 41
6. Électrophorégrammes obtenus avec la souche PA48-25 avant (A) et après (B) fermentation. Pic 1 (BSA), pic 2 (caséine αs2), pic 3 (caséine αs1), pic 4 (caséine β), pic 5 (caséine κ), pic 6 (β-lactoglobuline) et pic 7 (α-lactalbumine) 43
7. Suivi du % d'autolyse des souches LL30-3 et PA48-6 pendant 24 heures 49
8. Suivi du % d'autolyse des souches PO72-21 et RL34-3 pendant 24 heures 42

INTRODUCTION

L'industrie fromagère constitue un secteur d'activité extrêmement important. On estime à 125 000 tonnes métriques la production au Canada, dont 38.1 % au Québec (Anonyme a, 1994, Anonyme b, 1994), plaçant ainsi le Canada au 10e rang mondial. Malgré cette importance, l'industrie fromagère demeure un secteur vulnérable aux pertes économiques. En effet, l'accroissement de la productivité et l'utilisation répétée des mêmes ferments lactiques augmente le risque d'échecs fermentaires dû à la présence naturelle de bactériophages dans le lait cru et pasteurisé (Chopin, 1980). Un grand nombre de ferments est donc requis par l'usine afin de pouvoir effectuer la rotation des ferments. Les principaux ferments utilisés en industrie sont des ferments mixtes, dont la composition exacte n'est donc pas connue. On est donc aux prises avec des productions qui ne sont pas uniformes et avec des fromages dont la qualité et les rendements sont difficilement contrôlables, dû au manque de connaissances sur la composition exacte des ferments.

Comme les phages se répliquent seulement en présence d'un hôte compatible, le ferment influence la composition de la population phagique dans l'usine. Les ferments mésophiles contiennent plusieurs souches du genre *Lactococcus*. Essentiellement, les ferments sont divisés en deux groupes: mixtes ou définis (Roissart et Luquet, 1994a). Chez les ferments mixtes, on connaît habituellement les espèces bactériennes présentes mais on ignore le nombre de souches. Ces ferments ont été sélectionnés au fil des années, car ceux-ci résultaient en une production qui était régulièrement bonne et ils répondaient aux exigences de qualité. Comme ils sont cultivés à maintes reprises, la composition des ferments mixtes peut changer avec le temps. À l'opposé, les ferments définis sont des souches pures cultivées séparément et mélangées dans un ratio précis. Le nombre et le ratio des souches sont optimisés

pour augmenter le rendement fromager et pour pouvoir maîtriser aussi parfaitement que possible les productions fromagères.

Il est souhaitable d'utiliser des ferments résistants aux phages, mais il existe des situations où on ne peut se passer d'un ferment particulier, celui-ci ayant été spécialement sélectionné pour la fabrication de fromage Cheddar de longue maturation. La maturation fromagère est également une étape qui représente des coûts importants pour l'industrie. Ces coûts sont principalement dus à l'entreposage et à la réfrigération. Une meilleure connaissance des ferments, ainsi qu'une meilleure caractérisation des activités métaboliques de leurs souches semblent être des voies à privilégier afin de réduire les coûts reliés à la maturation et ainsi optimiser les productions fromagères.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

Les ferments lactiques peuvent être composés des genres bactériens: *Carnobacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* et certains *Streptococcus*. Ici, seulement les *Lactococcus* seront étudiés.

1.1 Les lactocoques

Les lactocoques sont des bactéries de forme sphérique, disposées en petites chaînettes. Ils sont Gram-positif, anaérobes facultatifs, non sporulant, non mobiles et ne possèdent pas de catalase. Leur température optimale de croissance est d'environ 30°C, c'est pourquoi on les appelle ferments mésophiles. Les lactocoques sont homofermentaires, c'est-à-dire qu'ils mènent à la production d'acide lactique à partir du lactose, glucose et galactose. Cette production d'acide est une caractéristique recherchée lors de la production fromagère. Le genre *Lactococcus* comprend une espèce et deux sous-espèces: *Lactococcus lactis ssp lactis*, ainsi que *Lactococcus lactis ssp lactis* var. *diacetylactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (Roissart et Luquet, 1994a).

1.2 Composition protéique du lait

Le lait de bovin contient environ 3.5 % de protéines, qui peuvent être séparées en deux classes sur la base de leur solubilité à pH 4.6 et à 20 °C: les caséines et les protéines sériques (Fox, 1983). Des protéines totales, 80 % sont sous forme micellaire. Les micelles sont constituées d'unités de caséines qui précipitent lors d'une acidification à pH 4.6 (Cheftel et al., 1985). Le tableau 1 présente la composition de la fraction protéique du lait.

Tableau 1: Concentration des différentes protéines du lait.

		Concentration dans le lait (g/Kg)	Pourcentage par rapport aux protéines totales (%)
	Protéines totales	33.0	100.0
	Caséines totales	26.0	79.5
	Protéines sériques	6.3	19.3
	Protéines de la membrane des globules de gras	0.4	1.2
Caséines	Caséine αs_1	10.0	30.6
	Caséine αs_2	2.6	8.0
	Caséine ß	9.3	28.4
	Caséine γ	0.8	2.4
	Caséine k	3.3	10.1
Protéines sériques	α-lactalbumine	1.2	3.7
	ß-lactoglobuline	3.2	9.8
	Sérumalbumine	0.4	1.2
	Immunoglobulines	0.7	2.1
	Autres	0.8	2.4

(Walstra et Jenness, 1984)

1.3 Les caséines

La caséine laitière est composée de quatre phosphoprotéines: les caséines αs_1, αs_2, ß et k. Elles sont présentes dans le lait en proportions relatives de 38, 10, 36 et 13 % respectivement (Davies et Law, 1980). Chacune des caséines se différencie des autres par sa composition en acides aminés, sa structure et ses propriétés (Dalgleish, 1989).

Le point isoélectrique des caséines est de 4.6. Étant phosphorylées, les caséines précipitent en présence d'ions calcium, à l'exception de la caséine k qui ne possède qu'un résidu phosphosérine. La sensibilité au calcium des différentes unités de caséine dépend donc de leur contenu en résidus phosphorylés (Slattery, 1976). Finalement, une très grande quantité de résidus prolines caractérise les caséines, particulièrement la caséine ß.

1.3.1 La caséine αs_1

La chaîne polypeptidique de la caséine αs_1 est composée de 199 acides aminés et son poids moléculaire est de 23 614 Da. C'est de loin la principale caséine de la fraction αs. Selon Brunner (1977), la caséine αs aurait tendance à s'associer via des interactions hydrophobes pour former l'unité fondamentale de la structure micellaire. De plus, la caséine αs serait moins susceptible à l'action de la plasmine que la caséine ß, en raison de son plus fort degré d'association à la structure de la micelle (Swaisgood, 1982). La caséine αs_1 s'agglutine et précipite à des pH près de la neutralité lorsqu'elle est en contact avec de faibles concentrations d'ions calcium (Walstra et Jenness, 1984). Elle lie environ huit moles de calcium au niveau de ses sites phosphorylés.

1.3.2 La caséine αs_2

La caséine αs_2 est composée de 207 acides aminés pour un poids moléculaire de 25 230 Da. C'est la moins abondante des caséines majeures du lait. La caséine αs_2 est insoluble en présence de calcium. Cette grande sensibilité aux ions calcium est due à sa composition; c'est la plus hydrophile de toutes les caséines car la plus phosphorylée (10 à 13 phosphates/mol) et la plus riche en résidus cationiques.

1.3.3 La caséine ß

La caséine ß est composée de 209 acides aminés et possède un poids moléculaire de 23 983 Da. C'est la plus hydrophobe de toutes les caséines (Swaisgood, 1982). Deux caractéristiques distinguent cette caséine des autres caséines: ses propriétés d'association-dissociation sont fortement dépendantes de la température et de sa solubilité, ainsi que de la présence d'ions calcium (Swaisgood, 1973). La caséine ß se polymérise à la température de la pièce. Alors qu'à 4 °C, la molécule demeure sous sa forme monomérique (Swaisgood, 1973). Les caséines γ présentes en faible quantité dans le lait, sont des produits d'hydrolyse de la caséine ß par la plasmine, une enzyme endogène du lait (Walstra et Jenness, 1984). Sous l'action de la plasmine, il y a libération des caséines γ_1, γ_2, γ_3, et des protéoses peptones. Ces caséines correspondent aux portions C-terminales de la caséine ß (Eigel et al., 1984; Cheftel et al., 1985).

1.3.4 La caséine κ

La caséine κ est formée de 169 acides aminés et possède un poids moléculaire de 19 007 Da. En raison de la faible quantité de phosphosérine au niveau de sa structure primaire (un seul groupement), la caséine κ ne fixe que deux moles de

calcium par mole de protéines à pH neutre. Contrairement aux autres caséines, sa solubilité est peu affectée par la présence de calcium (Walstra et Jenness, 1984). Par conséquent, la caséine κ est l'agent stabilisateur de la micelle (Swaisgood, 1982).

1.4 La micelle de caséine

L'opacité du lait est partiellement provoquée par la présence de très gros complexes sphériques colloïdaux contenant du phosphate et du citrate de calcium: les micelles de caséines (Swaisgood, 1973). Environ 80 à 90% de la caséine d'un lait normal s'organise sous cette forme (Roissart et Luquet, 1994a). Les micelles sont des agrégats sphériques de caséines composés d'un nombre d'unités de caséine variant de 450 à 10 000 (Slattery, 1976). Des associations de nature hydrophobe sont responsables, dans un premier temps, de l'organisation des caséines en sous-micelles. Elles sont formées de 20 à 25 monomères de caséine (Brunner, 1977) dont les diamètres sont de l'ordre de 10 à 20 nm. L'eau occupe l'espace entre ces sous-unités (1.5 g eau / g protéines), conférant à la micelle une structure ouverte (Walstra et Jenness, 1984).

Les micelles sont composées de 94% de caséines sur base sèche et leur diamètre varie de 30 à 300 nm. En plus de son contenu protéique, la micelle contient 8% de sels, principalement du calcium et du phosphore, qui s'assemblent en phosphate de calcium colloïdal pour assurer le lien entre les micelles.

1.5 Les protéines du lactosérum

D'une façon générale, Eigel et al. (1984) définissent les protéines du lactosérum comme le groupe qui demeure soluble dans le sérum du lait après précipitation des caséines à pH 4.6 et à 20°C. Ce groupe comprend plusieurs protéines, mais l'α-lactalbumine et la ß-lactoglobuline représentent de 70 à 80 % des

protéines totales du lactosérum. Globalement, les protéines du lactosérum sont riches en acides aminés soufrés et sont de structure globulaire compacte et stable (Cheftel et al., 1985).

1.5.1 L'α-lactalbumine

L'α-lactalbumine est composée de 123 acides aminés et son poids moléculaire est de 14 175 Da. Chacune des cystéines de la molécule réagit avec une autre pour former quatre ponts disulfures intramoléculaires. Ceci rend la protéine peu susceptible à participer à des échanges de ponts disulfures, excepté à de hautes températures.

1.5.2 La ß-lactoglobuline

La ß-lactoglobuline est la principale protéine du lactosérum. Elle contient 162 acides aminés pour un poids moléculaire de 18 277 Da (Eigel et al., 1984). La ß-lactoglobuline précipite aux températures élevées et en absence de caséine. En présence de caséines, l'échange de ponts disulfures entre la ß-lactoglobuline et la caséine k augmente la stabilité thermique du lait et le temps de coagulation par la présure (Brunner, 1977).

1.6 Les étapes de fabrication du fromage

Bien que les étapes de fabrication puissent être légèrement différentes d'un type de fromage à un autre, les étapes de base pour la plupart des variétés sont l'acidification, la coagulation, l'égouttage (découpage, brassage, cuisson, pressage etc.) et le salage.

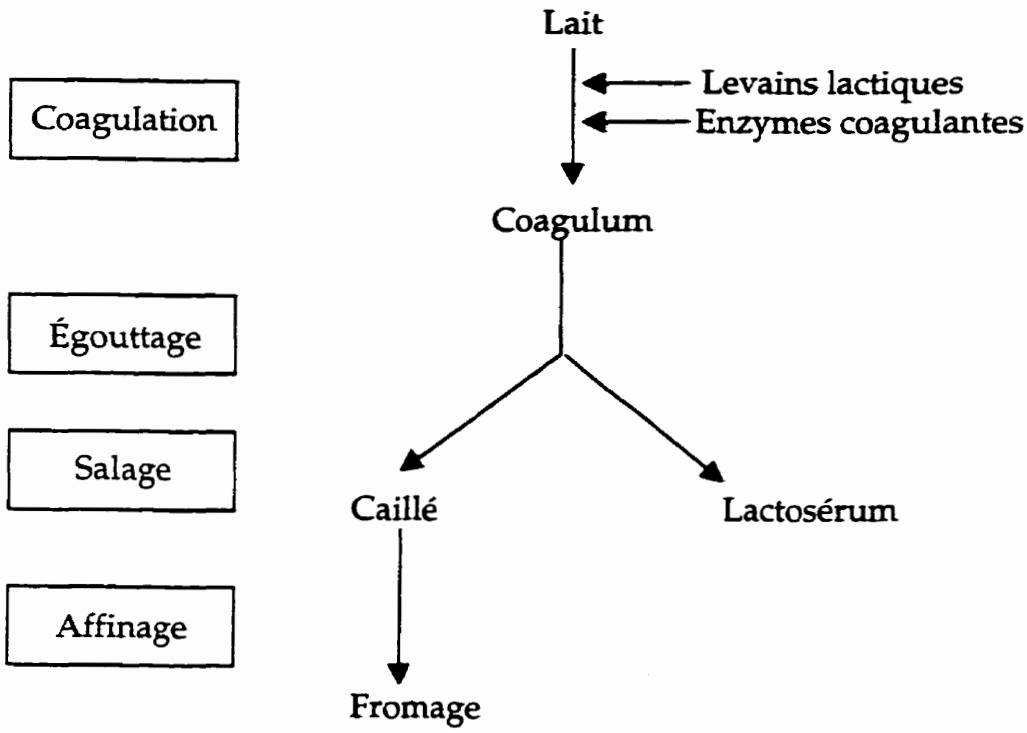


Figure 1: Les principales étapes de la transformation fromagère.

L'acidification du lait est provoquée par l'activité des bactéries lactiques, tandis que la coagulation s'effectue par l'action de la présure, une enzyme coagulante jusqu'à un pH d'environ 4.6. Cette acidification entraîne des modifications physico-chimiques au niveau des protéines, ce qui mène à la formation d'un réseau. La coagulation s'effectue sous des conditions bien précises, déterminées en fonction de la variété de fromage à fabriquer. Dans le cas du Cheddar, le lait est porté à 30°C et est légèrement acidifié par une culture lactique avant l'emprésurage. Par la suite, le lait est mélangé de façon à disperser uniformément l'enzyme coagulante. Laissé au repos, le lait forme au bout de 20 à 30 minutes un gel nommé coagulum (Fox, 1987).

Vient ensuite l'égouttage, qui permet d'éliminer une partie du lactosérum emprisonné dans le coagulum. Dans le cas du Cheddar, l'égouttage fait appel à différentes techniques telles le découpage, le brassage, la cuisson, la cheddarisation et le pressage. L'égouttage conduit à l'obtention du caillé (voir figure 1).

La troisième étape est le salage. Le sel permet de parfaire l'égouttage du caillé, d'inhiber la croissance des micro-organismes indésirables et de contrôler les réactions enzymatiques qui régissent le processus d'affinage. Le sel contribue aussi largement aux caractères organoleptiques du fromage.

La quatrième étape, la maturation est une étape importante de la production du fromage. C'est à ce moment que se développera la saveur recherchée du fromage, dû à l'action des différentes enzymes provenant du coagulant, du lait et des ferments lactiques.

La maturation implique trois évènements biochimiques principaux: la glycolyse du lactose résiduel et des constituents monosaccharidiques; glucose et galactose, la lipolyse et la protéolyse (Fox et McSweeney, 1996). La protéolyse est le phénomène le plus complexe et, dans la plupart des variétés, l'évènement le plus

important dans la maturation du fromage. Le sujet a été revu par plusieurs auteurs tels que Rank et al., 1985, Grappin et al., 1985, Fox, 1989, Fox et Law, 1991 et Fox et al., 1996. La protéolyse contribue en grande partie à:

1. Changements de texture via:
   a) L'hydrolyse du réseau de protéines.
   b) La diminution de l'a_w par la liaison de l'eau, dû à la libération des groupes carboxyls et aminés.
   c) L'augmentation du pH dû à la production de NH_3 par la déamination des acides aminés libres.

2. Contribution directe à la saveur (peptides, acides aminés) ainsi qu'aux mauvaises saveurs (surtout à l'amertume, dû aux peptides hydrophobes).

3. Libération de substrats (acides aminés) pour d'autres réactions générant de la saveur (ex: déamination, décarboxylation, désulfuration).

4. Relâchement de composés sapides de la matrice du fromage pendant la mastication.

1.7 Les agents protéolytiques du fromage

La protéolyse pendant la maturation du fromage est catalysée par des enzymes provenant de:

1. Coagulant
2. Lait
3. Ferment lactique
4. Inoculum secondaire (si nécessaire)

1.7.1 Enzymes coagulantes

La présure contient deux enzymes : la chymosine et la pepsine, mais la chymosine est la principale protéinase présente dans la présure traditionnelle utilisée pour la fabrication du fromage (Rothe et al., 1977). Elle provient de l'estomac de jeunes veaux. Le principal rôle de la chymosine dans la production du fromage est l'hydrolyse spécifique du lien Phe_{105}-Met_{106} de la caséine κ, ce qui résulte en une déstabilisation de la micelle de caséine. Cette hydrolyse donne lieu à deux composés, soit la paracaséine κ et le caséinomacropeptide. La paracaséine κ est insoluble et se retrouve dans le caillé, alors que le caséinomacropeptide est soluble; il se retrouve donc dans le lactosérum (Fox et McSweeney, 1996). Typiquement, environ 3 à 6 % de la chymosine ajoutée est retenue dans le caillé (Fox et McSweeney, 1996), ce qui confirme son rôle au niveau de la protéolyse primaire (hydrolyse des caséines), plutôt que lors de la maturation.

Cependant, bien que la chymosine soit encore beaucoup utilisée en industrie, on cherche à lui trouver des substituts en raison de son coût élevé et de sa disponibilité limitée. En effet, la présure est dépendante de la disponibilité des caillettes de jeunes veaux, une matière variable, coûteuse et difficile d'approvisionnement (Fox, 1987). De nombreuses recherches ont donc été entreprises afin de développer des enzymes de substitution d'origine animale, végétale ou microbienne. Ces enzymes, en plus de provoquer la coagulation du lait, doivent posséder un certain nombre de propriétés physico-chimiques et technologiques spécifiques afin d'être utilisables en fromagerie. Ces enzymes doivent par exemple présenter un rapport activité coagulante/activité protéolytique élevé, c'est-à-dire que l'activité coagulante doit primer sur l'activité protéolytique. Une activité protéolytique trop intense et non spécifique durant la fabrication conduit à la formation d'un coagulum moins ferme et à des pertes de matières grasses plus

élevées ce qui engendre une diminution des rendements fromagers. Lors de l'affinage, l'activité protéolytique de l'enzyme doit être similaire à celle de la présure (pas trop importante), car une activité trop importante peut éventuellement mener à la production de peptides amers et à des défauts de texture. Les enzymes de substitution doivent aussi être actives sous les conditions de pH et de température utilisées lors de la fabrication fromagère. De plus, l'activité coagulante de ces enzymes ne doit pas être perturbée par la présence de calcium. Finalement, puisqu'une certaine proportion de l'enzyme se retrouve dans le lactosérum suite à l'égouttage du coagulum, la protéase doit pouvoir être inactivée par la chaleur afin d'éviter la protéolyse des protéines sériques, ce qui gêne leur utilisation ultérieure. Le tableau suivant donne un aperçu des enzymes de substitution qui pourraient éventuellement être utilisées industriellement.

Tableau 2 : Les enzymes de substitution.

Origine		Enzymes
Animale	Ruminants	
	Chevreaux et agneaux	Chymosine et pepsine
	Bovins adultes	Pepsine et chymosine
	Monogastriques	
	Porcs	Pepsine
	Oiseaux	
	Poulets	Pepsine
Végétale	Figuier	Ficine
	Ananas	Broméline
	Artichaut	
Fongique	*Endothia parasitica*	Protéase
	Mucor pusillus lindt	Protéase
	Mucor miehei	Protéase
	Aspergillus niger	Chymosine génétique
	Kluyveromyces lactis (levure)	Chymosine génétique
Bactérienne	*Escherichia coli* K12	Chymosine génétique

(Perennou, 1997; Fox, 1987)

Avec l'avènement des biotechnologies, il est maintenant possible de produire par manipulation génétique de la chymosine recombinante pure et à volonté. Cette technique consiste à cloner le gène responsable de la synthèse de la chymosine chez le veau dans certains micro-organismes (Muir, 1997). Comme le montre le tableau 2, le clonage a été réalisé avec succès dans *Aspergillus niger, Kluyveromyces lactis* et *Escherichia coli* K12.

1.7.2. Protéinases indigènes du lait

La principale enzyme du lait est la plasmine. Elle possède un pH optimal de 7.5 à 37°C. La plasmine est très spécifique à la lysine et dans une moindre mesure à l'arginine, lorsque ceux-ci sont présents à l'extrémité carboxyl. La plasmine est active sur toutes les caséines, mais particulièrement sur les caséines αs_2 et ß (Fox et McSweeney, 1996).

1.7.3. Enzymes protéolytiques des lactocoques

Les ferments lactiques utilisés en industrie fromagère sont composés en grande majorité de lactocoques. Cette flore joue trois grands rôles (Juillard et al., 1996); elle est tout d'abord responsable de l'acidification du lait à la suite de l'hydrolyse du lactose; elle est également à l'origine de la formation de saveur, dû principalement à son activité protéolytique, qui consiste en la dégradation enzymatique des protéines du lait, ce qui mène à la formation de composés sapides (peptides amers) ou de précurseurs d'arôme (acides aminés). La présence d'aminopeptidases intracellulaires permet cependant d'éliminer les peptides amers formés et d'augmenter la concentration d'acides aminés libres. Enfin, elle permet de limiter le développement de germes indésirables, grâce à la production d'acide et d'éventuelles substances inhibitrices telles les bactériocines. Pour pouvoir jouer ces différents rôles, la flore lactique doit atteindre un niveau de population assez

important. Dans le lait, le principal facteur susceptible de limiter la croissance des lactocoques est leur nutrition azotée (Juillard et al., 1996). L'azote assimilable y est présent sous trois formes: acides aminés libres, peptides et caséines.

1.7.3.1 Utilisation des acides aminés

Le lait contient de l'ordre de 85 mg/ml d'acides aminés libres (Mills et Thomas, 1981; Juillard et al., 1995). Cependant, certains y sont présents en faible quantité. En particulier, deux des acides aminés essentiels à la croissance de *L. lactis*, isoleucine (Ile) et leucine (Leu), sont présents à des concentrations nettement inférieures à celles requises pour atteindre une forte densité cellulaire (Juillard et al., 1996). La protéolyse est donc une étape très importante pour la bonne croissance du ferment dans le lait.

1.7.3.2 Utilisation des peptides

Pour l'utilisation des peptides par la cellule bactérienne, trois systèmes de transport ont été mis en évidence. Le système Opp transporte exclusivement des oligopeptides contenant au moins quatre acides aminés. La taille supérieure limite n'est pas connue avec certitude. Il a été établi que des oligopeptides de huit acides aminés sont transportés par le système Opp (Kunji et al., 1993), mais il semble que des peptides contenant jusqu'à onze acides aminés puissent être transportés (Foucaud et al.,1995). Deux autres systèmes de transport existent chez *L. lactis*, soit le Dtp T et le Dtp P, qui effectuent le transport des di et tripeptides. Le système Dtp T transporte préférentiellement les di et tripeptides hydrophiles, alors que le Dtp P transporte surtout les di et tripeptides hydrophobes.

L'utilisation des peptides du lait, alliée à celle des acides aminés libres, permet d'atteindre des densité de population de l'ordre de 10^8 ufc/ml (Juillard et al., 1996).

La principale source d'azote des lactocoques, responsable de 90% de leur croissance, est les caséines du lait (Juillard et al., 1996). Leur utilisation met en oeuvre un système complexe, qui fait intervenir plusieurs enzymes.

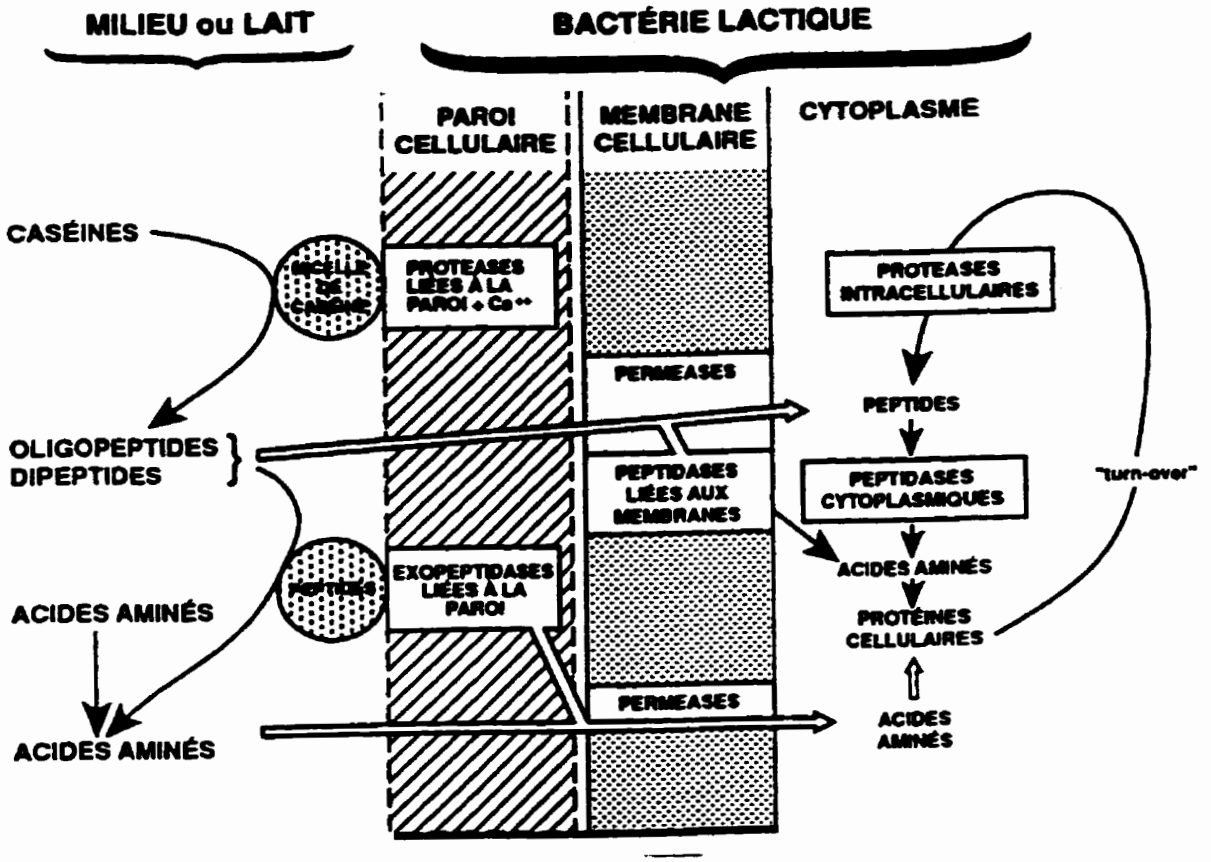


Figure 2: Système protéolytique des lactocoques (Mierau, 1997).

La protéase de paroi (Prt P) réalise la première étape du processus de dégradation des caséines du lait. Sa présence est nécessaire au développement de *L. lactis* jusqu'à de fortes densités cellulaires (Thomas et Mills, 1981). Il s'agit d'une sérine protéinase associée à l'enveloppe extracellulaire de la cellule. Le Ca^{2+} est nécessaire à son attachement à l'enveloppe cellulaire et son pH optimum est de 5.5 - 6.5 (Law et Haandrikman, 1997). On distingue deux principales catégories de protéases, basé sur leur spécificité d'action sur les caséines du lait.

Tableau 3: Spécificité de substrat des protéases de paroi de *Lactococcus lactis*.

	Type de protéase	
	P_I	P_{III}
Substrats préférentiels	Caséine ß (k dans une moindre mesure)	Caséines ß, αs_1, k
Souche type	*L. lactis* Wg2	*L. lactis* SK11

(Juillard et al., 1996)

Sept autres groupes ayant des spécificités différentes de celles des protéinases P_I et P_{III} ont aussi été identifiés. (Exterkate et al., 1993). Il existe aussi des souches qui sont protéinase-négatives. Il s'agit généralement de souches qui ont perdu le plasmide codant pour la synthèse de la protéase de paroi. Cependant, les souches Prt$^-$ gardent souvent leurs systèmes de transport des acides aminés et des peptides, ce qui leur confère une activité peptidasique semblable à celles des souches Prt$^+$.

L'utilisation des souches Prt$^-$ présente plusieurs avantages. Tout d'abord, il semblerait que ces souches soient moins sensibles à l'attaque des phages parce qu'elles se développent plus lentement. L'utilisation de ces variants réduirait également l'amertume, car l'hydrolyse de la caséine β résulte en la production de peptides amers. Or, les souches Prt$^-$ ne peuvent pas dégrader la caséine β. De plus et lors d'une fabrication fromagère, toute protéolyse s'accompagne par une perte d'azote dans le lactosérum, donc par une baisse de rendement fromager. Des pertes de 4 à 7 % de caséine ont été enregistrées avec les souches de *L. Lactis ssp cremoris* Prt$^-$ (Roissart et Luquet, 1994b)). De ce fait, L'utilisation de ferments mixtes contenant des souches Prt$^-$ semble être une stratégie efficace pour augmenter les rendements fromagers.

La protéase de paroi dégrade donc les caséines du lait en peptides. Ces peptides sont pris en charge principalement par le système Opp et sont incorporés dans la cellule. Ces peptides sont ensuite dégradés, par des peptidases, en acides aminés, responsables directement ou indirectement de la formation de la saveur du fromage. (Lawrence et al., 1987; Olson, 1990).

Les peptidases des lactocoques peuvent être divisées en deux groupes majeurs, soit les endopeptidases, qui hydrolysent à l'intérieur des chaînes peptidiques, et les aminopeptidases, qui coupent un ou deux acides aminés à l'extrémité N-terminale des peptides. Aucune carboxypeptidases, qui dégradent les peptides à l'extrémité C-

terminale, n'ont été retrouvées chez les lactocoques (Smid et al., 1991). Les aminopeptidases, à leur tour, sont réparties en trois groupes, soient les métallo-aminopeptidases, les cystéine aminopeptidases et les sérine aminopeptidases.

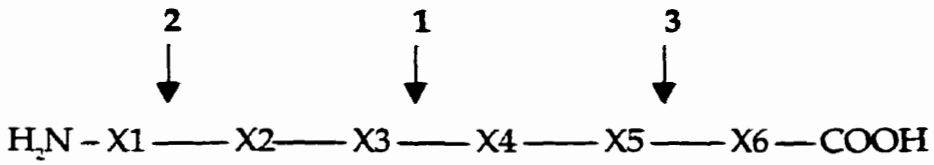


Figure 3: Représentation d'une chaîne peptidique et classification des peptidases. (1) Endopeptidase, (2) Aminopeptidase (3) Carboxypeptidase.

Les métalloaminopeptidases représentent le groupe majeur (2/3) des aminopeptidases. Leur activité est régulée par la présence de cations métalliques divalents. Le cation Zn^{2+} est celui qui est le plus fréquemment associé à ces enzymes (Gonzales et Robert-Baudouy, 1996). Les métalloaminopeptidases sont inhibées par des agents chélatants comme l'EDTA, le 1,10-phenanthroline etc...). Les cystéine et les sérine aminopeptidases, elles, n'ont pas de cofacteur ionique associé à leur structure. Elles sont respectivement sensibles au Hg^{2+}, iodoacetamide, N-ethylmaleinaide, p-chloromercuribenzoate et au phenylmethylsulfonyl fluoride, diisopropyl fluorophosphate. Le tableau 4 présente un résumé des principales peptidases des lactocoques qui peuvent être impliquées dans la dégradation des peptides, ainsi que leurs principales caractéristiques (Mierau et al., 1997).

Tableau 4: Peptidases de *Lactococcus lactis*.

Endopeptidases				
Enzyme	**Classe d'enzyme**	**Poids moléculaire (KDa)**	**Substrat**	**Référence**
Pep F	métallo	70	bradykinine	Monnet et al., 1994
Pep O	métallo	71.5	metenkephal-ine	Baankreis, 1992
AMINOPEPTIDASES				
Aminopeptidases à activité générale				
Pep N	métallo	95	1↓2-3-4...	Exterkate et al., 1992
Pep C	thiol	50	1↓2-3-4...	Chapot-Chartier et al., 1993
Pep T	métallo	46	1↓2-3	Bacon et al., 1993
Peptidase 53	thiol	23	1↓2-3	Bacon et al., 1993
Pep V	métallo	49	1↓2	Desmazeaud et Zevaco, 1977
Aminopeptidases à activité spécifique				
Pep A	métallo	38	Glu↓2-3... Asp↓2-3... Ser↓2-3...	Bacon et al., 1994
PCP	serine ou thiol	25	Pyr-Glu↓2-3...	Baankreis, 1992
Pep XP	serine	88	1-Pro↓3-4...	Booth et al., 1990a
Pep P	métallo	43	1↓Pro-Pro-4...	Mars et Monnet, 1995
PIP	métallo	50	Pro↓2(-3)	Baankreis et Exterkate, 1991
PRD	métallo	42	1↓Pro	Booth et al., 1990b

1.8 L'autolyse des bactéries lactiques

Lorsque le milieu est riche en nutriments, les bactéries se développent rapidement et entrent dans une phase exponentielle de croissance. Après cette croissance rapide, les cellules entrent dans une phase dite stationnaire, où le nombre de cellules n'évolue plus. Les cellules sont encore en partie métaboliquement actives. Il survient ensuite, plus ou moins rapidement selon les espèces, une phase de déclin où le nombre de cellules viables diminue rapidement. Cette phase correspond à l'autolyse spontanée des cellules. Les cellules perdent leur intégrité, s'ouvrent et libèrent leurs enzymes dans le milieu (Lortal, 1995).

L'autolyse survient grâce à des enzymes bactériennes appelées autolysines ou hydrolases. Ces enzymes sont localisées dans la paroi même des bactéries. Elles jouent habituellement un rôle positif au sein de la bactérie en lui permettant de s'allonger et de se diviser en deux cellules filles en effectuant des coupures limitées en certains sites du peptidoglycane. Cependant, lorsque le milieu devient défavorable ou à l'occasion d'un choc (thermique, osmotique...) les autolysines hydrolyseraient de manière excessive ou inadéquate le peptidoglycane, ce qui mène à l'autolyse de la cellule (Lortal, 1995).

1.8.1 Impact de l'autolyse sur la maturation fromagère

Les bactéries participent, à l'aide de leurs enzymes, à la maturation du fromage. Or, il est maintenant prouvé que les peptidases des bactéries lactiques sont essentiellement intracellulaires (Pritchard et Coolbear, 1993; Visser, 1993; Lortal, 1995). L'autolyse est donc la voie incontournable qui permet leur libération dans le cailler fromager. Il semble donc logique que l'ampleur de l'autolyse des ferments lactiques ait un impact important sur l'étape clé de la maturation qu'est la protéolyse.

Selon Crow et al. (1995), on a observé un niveau plus élevé d'acides aminés libres produits lorsqu'une souche très autolytique est utilisée. Les peptidases des ferments sont également plus stables suite à l'autolyse. Finalement, des fromages non amers sont souvent associés à une augmentation de l'autolyse du ferment. En effet, l'autolyse permet de relâcher les enzymes intracellulaires dans le caillé à un stage plus précoce. Les enzymes responsables de la maturation du fromage comme les peptidases, les lipases et les esterases peuvent accélérer le développement de la saveur ou la qualité du fromage (Crow et al., 1995).

Les ferments utilisés à la base de cette étude sont des ferments mixtes. Ceci présente quelques inconvénients dû au fait que le nombre et les caractéristiques des souches qui les composes ne sont pas connus précisément. En effet, les souches du ferment peuvent être par exemple sujettes à l'attaque par une même famille de phages. Ceci fait que l'on doit avoir en main plusieurs ferments pour pouvoir faire une rotation afin d'éviter les contaminations phagiques et l'échec de la production fromagère. Il peut également arriver que le mélange de souches soit incompatible et qu'une ou quelques souches soient dominantes, ce qui se traduit par un taux de production d'acide variable et imprédictible même si une attention particulière est apportée à la sélection et à la manipulation des ferments. Une façon de contrôler ces difficultés est de bien caractériser les souches composant les ferments, bien que cela soit relativement difficile, dû aux nombreux changements qui ont pu survenir à l'intérieur du ferment au fil des ans. Cette caractérisation permet cependant d'avoir une production beaucoup plus constante, de mieux contrôler la sensibilité aux phages et de pouvoir augmenter la qualité et le rendement fromager.

L'hypothèse de ce projet est que l'utilisation d'un ferment reconstitué à partir de souches pures caractérisées au niveau des activités protéolytiques, autolytiques et aminopeptidasiques et de la sensibilité aux phages permettrait d'une part de mieux connaître le ferment et d'autre part de recomposer un ferment mixte selon les

caractéristiques recherchées. Une telle stratégie permettrait de produire, de façon invariable et continue, un fromage de haute qualité.

L'objectif de ce projet consiste à caractériser, au niveau des activités protéolytiques et autolytiques, une banque de souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* isolés de ferments mixtes en vue de réassembler de nouveaux ferments lactiques mésophiles ayant d'excellentes aptitudes fromagères. Le projet consiste également à mettre au point un modèle prédictif pour la formation de nouveaux ferments.

Chapitre II

Caractérisation des activités protéolytiques et autolytiques de souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* utilisées en production fromagère

RÉSUMÉ

Des souches pures ont été isolées à partir de treize ferments lactiques mésophiles, puis caractérisées et évaluées pour leurs activités autolytiques, protéolytiques et aminopeptidasiques. Au niveau de l'autolyse, les meilleures souches ont montré une autolyse de 40% en moins de 3.0 h, alors qu'une autolyse de seulement 10 % a été obtenue pour les souches produisant un fromage de moins bonne qualité. L'activité protéolytique a été évaluée sur un lait non fermenté, à l'aide de la méthode de l'agar au lait et sur un lait fermenté avec la méthode de l'OPA (*o*-phthaldialdéhyde). Les souches testées ont montré une activité protéolytique allant de 1 à 65 mM (concentration de liens NH_2). À l'aide du SDS-PAGE, nous avons observé que les souches hautement protéolytiques dégradent toutes les caséines du lait (α, β et κ), ainsi que les protéines du lactosérum. L'activité aminopeptidasique a été déterminée à l'aide des substrats leucine-paranitroanilide (Leu-pNa) et glutamyl-paranitroanilide (Glu-pNa). Les souches possédant une activité aminopeptidasique élevée ont tendance à donner les meilleures caractéristiques organoleptiques aux fromage produit. La détermination simultanée des activités autolytiques, protéolytiques et aminopeptidasiques nous a permis de développer un modèle prédictif pour la sélection et le développement de nouveaux ferments ayant des aptitudes fromagères particulièrement adaptées au fromage Cheddar.

2.1 Introduction

L'industrie fromagère est une activité économique très importante au Canada et particulièrement au Québec. Environ 48 000 tonnes métriques de fromage sont produites annuellement. Cinquante pour cent de cette production est constituée de fromage Cheddar et la moitié de ce Cheddar sera soumis à la maturation fromagère pendant plusieurs mois afin qu'il développe la saveur désirée. Ceci représente des coûts importants, qui sont principalement dû à l'entreposage et à la réfrigération. Plusieurs stratégies ont été proposées pour réduire les coûts associés à la maturation, dont plusieurs sont basées sur une meilleure connaissance des ferments, ainsi que sur une meilleure caractérisation des activités métaboliques des souches composant ces ferments.

Le développement de la saveur fromagère est un phénomène complexe, dans lequel plusieurs composés sont impliqués (Fox et McSweeney, 1996). Selon plusieurs données, il est généralement dit que les bactéries lactiques sont les plus important contributeurs au développement de la saveur du fromage Cheddar. Les bactéries lactiques sont impliquées à deux niveaux différents lors de la production fromagère. Au début, lors de la production d'acide et du caillage, la présure est l'enzyme active majeure qui agit au niveau des protéines du lait, cependant le rôle des bactéries lactiques à cette étape reste mineur. De plus, la présence de bactéries lactiques possédant une activité protéinasique élevée à été associée au développement de saveurs indésirables comme l'amertume (Fox et McSweeney, 1996). En second lieu, lors de la maturation du fromage, les ferments lactiques jouent un rôle très important dans la matrice fromagère en relâchant leur contenu intracellulaire. Les enzymes relâchées hydrolysent les oligopeptides produits pendant le stade initial en petits peptides et en acides aminés, qui contribuent au développement de la saveur et de la texture du fromage. En se basant sur cette description, nous pouvons prédire qu'une

bonne souche bactérienne devrait posséder une activité protéinasique faible, mais des activités peptidasiques et autolytiques élevées.

L'objectif de ce travail est de caractériser des souches de lactocoque au niveau des activités protéinasiques, autolytiques et aminopeptidasiques et de développer un modèle prédictif afin de prédire les aptitudes des bactéries lactiques à produire un fromage possédant de très bonnes caractéristiques organoleptiques.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Les souches bactériennes

L'identification et la différenciation des souches s'est fait par analyse du profil plasmidique des isolats préparés d'un même ferment. Les souches possédant des profils plasmidiques différents ont été retenues pour effectuer la caractérisation des activités protéolytiques et autolytiques.

Toutes les souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* utilisées dans cette étude sont capables d'utiliser le lactose comme source d'énergie (souches lactose-positif). Les souches ont été conservées à -80°C dans de la poudre de lait écrémé (Low-Heat, Rosell, Montréal, Canada) reconstituée à 6 % contenant du glycérol à 20 %.

2.2.2 Conditions de culture

Les précultures ont été effectuées dans 15 ml de poudre de lait écrémé reconstituée à 6 % à 30°C pendant 18 heures. Ces précultures sont utilisées pour inoculer le fermenteur à raison de 1 %. Le lait utilisé comme milieu de culture a été préalablement chauffé à 90°C pendant 45 minutes. La fermentation est effectuée à 30°C à un pH contrôlé à 5.8 avec du NH_4OH 6N jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance de la souche bactérienne utilisée (Fermenteur BioFlo Model C30, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA). Le milieu de fermentation obtenu est utilisé pour effectuer le SDS-PAGE, le test d'OPA ainsi que le suivi de l'autolyse et de l'activité aminopeptidasique. Toutes les fermentations ont été effectuées en duplicata et les résultats sont présentés sous forme de moyenne et d'écart type. Pour le test sur agar au lait, les précultures ont été effectuées dans 15 ml de milieu Elliker (Fisher Scientific, Nepean, Canada) à 30°C pendant 18 heures.

2.2.3 Activité protéolytique

2.2.3.1 SDS-PAGE

Un échantillon de lait est prélevé au début et à la fin de chaque fermentation. On mélange 65 µl de lait + 4935 µl de tampon SDS + 100 µl de mercaptoéthanol (Biorad, Mississauga, Canada) et on chauffe le tout à 100°C pendant 5 minutes. On fait ensuite migrer les échantillons sur un gel d'acrylamide 20% (Phast Gel Homogeneous 20, Pharmacia, Uppsala, Suède) à l'aide d'un Electrophoresis Phast System de Pharmacia (Uppsala, Suède). Les gels sont colorés au nitrate d'argent et soumis à un ultroscan pour leur lecture. Des électrophorégrammes de chaque échantillon sont obtenus avant et après fermentation pour calculer le pourcentage d'hydrolyse de chacune des protéines du lait (caséines et protéines du lactosérum).

2.2.3.2 OPA (*o*-phthaldialdehyde) (Church et al., 1983)

La mesure de l'activité protéinasique a été effectuée selon la méthode de Church et al. (1983) modifiée. Cette méthode est basée sur la réaction de l'OPA et du β-mercaptoéthanol avec les groupements α-aminés relâchés lors de l'hydrolyse des protéines du lait. Ils forment alors un complexe qui absorbe fortement a 340 nm. La solution d'OPA est obtenue en combinant les réactifs suivants et en complétant à un volume de 50 ml avec de l'eau: 25 ml de tetraborate de sodium 100 mM (Sigma, Oakville, Canada), 2.5 ml de SDS 20 %, 40 mg d'OPA (Sigma, Oakville, Canada) (dissout dans 1 ml de méthanol) et 100 µl de mercaptoéthanol (Biorad, Mississauga, Canada). Ce réactif doit être préparé le jour même. Pour mesurer l'activité protéolytique, avec les protéines du lait comme substrat, un alliquot de 150 µl (d'une dilution 1:25 du lait dans du SDS 1%) est ajouté à 3.0 ml du réactif d'OPA dans une cuvette de 3.0 ml. La solution est agitée par inversion et incubée 2 minutes à la

température de la pièce, puis l'absorbance est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (LKB Biochrom, Novaspec II, Opti Ressources, Charny, Canada). L'échantillon est analysé par rapport à une courbe standard déterminée à l'aide de la D-L-leucine (Sigma, Oakville, Canada).

2.2.3.3 Agar au lait

Cette gélose est préparée comme suit :

Solution A- Agar 3% + extrait de levure 1%. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Solution B- Poudre de lait écrémé 6% + bromocrésol pourpre 0.006% (Difco, Détroit, U.S.A).
Autoclaver à 121°C pendant 10 minutes.

Les deux solutions sont mélangées pour obtenir des concentrations finales de :

Agar 1.5%
Extrait de levure 0.5%
Lait 3.0%
Bromocrésol pourpre 0.003%

Dans notre cas, le bromocrésol pourpre est ajouté pour mieux visualiser la zone d'hydrolyse.

Des puits sont formés dans la gélose et l'on y dépose 25 µl des cultures bactériennes, dont la densité optique a été ajustée à une même valeur. Les Pétri sont incubés à 30°C pendant 48 heures. L'activité protéinasique est déterminée en mesurant le diamètre de l'auréole d'hydrolyse obtenu. Une courbe standard est parallèlement effectuée à l'aide de la trypsine aux concentrations de 0.25, 0.50, 1.0 et

2.0 mg/ml. Ainsi, l'activité protéinasique est exprimée en unité trypsique par millilitre.

2.3 Détermination de l'activité autolytique

Un volume de 100 ml est prélevé de la fermentation et on ajuste le pH à 6.8 avec du NaOH 1.0 N filtré 0.22 µm. Les protéines du lait sont solubilisées par l'ajout de citrate de sodium 1% et par agitation pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec de l'eau peptonée stérile (centrifugation à 16 270 g, 10°C, 10 minutes) et resuspendues dans un tampon NaH_2PO_4 0.1 M + NaCl 0.5 M, pH 5.2 de façon à obtenir une densité optique autour de 1.000 à 650 nm. Les préparations ainsi obtenues ont été utilisées pour la détermination de l'activité autolytique selon la méthode de Dako et al. (1995) modifiée.

La méthode consiste à placer les cellules dans un tampon et à suivre la diminution de la densité optique afin de pouvoir mesurer le pourcentage d'autolyse des souches. Une partie de la suspension obtenue précédemment (voir 2.3) est prélevée et on y ajoute 1 mg/ml de lysozyme. On incube les deux solutions (avec et sans lysozyme) à 30°C et on effectue des lectures de la diminution de la densité optique à 650 nm pendant 24 heures. L'autolyse est exprimée en pourcentage d'autolyse des cellules, qui est défini comme suit : $(A_0 - A_t) \times 100 / A_0$ ou A_0= l'absorbance initiale et A_t = l'absorbance mesurée après t heures d'incubation.

2.4 Activité aminopeptidasique (El Soda et Desmazeaud, 1982)

Les mêmes préparations utilisées pour la détermination de l'activité autolytique ont été utilisées pour la mesure de l'activité aminopeptidasique. La méthode de El Soda et Desmazeaud (1982) a été alors utilisée avec quelques modifications. Cette méthode est basée sur la mesure de la libération d'une substance chromogène, le p-nitroanilide (pNa), attaché à différents acides aminés. Les substrats

utilisés dans cette étude sont la Leu-pNa et le Glu-pNa (Sigma, Oakville, Canada) pour la mesure de l'activité des aminopeptidases Pep N et Pep A. Chaque substrat est préparé dans du méthanol à une concentration de 6 mg/ml. La solution de Glu-pNa est de plus centrifugée pour obtenir une solution claire et on y ajoute de l'azoture de sodium à 0.02 % pour éviter toute autre croissance (temps d'incubation beaucoup plus long). La réaction est démarrée en combinant 1850 µl de tampon Tris-HCl 0.01 M pH 5.2 filtré 0.22 µm, 100 µl de la suspension de cellules et 50 µl de Leu-pNa ou Glu-pNa. La solution est incubée à 30°C et des lectures au spectrophotomètre à 420 nm sont prises pendant 24 heures (Leu-pNa) ou 72 heures (Glu-pNa).

2.5 Résultats

Un total de 26 souches provenant de treize ferments ont donc été caractérisées au niveau des activités protéinasiques, autolytiques et aminopeptidasiques.

2.5.1 Activité protéinasique :

Les résultats obtenus à l'aide de la méthode de l'agar au lait (tableau 5) varient de 0 à 1.31 mg/ml unité trypsine, alors que ceux obtenus par la méthode de l'OPA (tableau 6) varient de 0.33 à 64.58 mM (concentration de liens NH_2). L'étendu des résultats est beaucoup plus grand pour l'OPA, car le test est effectué après une fermentation à pH contrôlé. Les souches protéinase positive ont donc une croissance plus élevée, ce qui permet également d'avoir une protéolyse plus élevée. Les résultats de l'agar au lait peuvent être obtenus en 48 heures. Cette méthode est donc rapide et elle nécessite peu de matériel. Les résulats obtenus sont cependant un peu moins précis que ceux obtenus avec l'OPA, car la délimitation de l'auréole est parfois floue.

Une bonne corrélation a été obtenue pour la caractérisation des souches à l'aide de ces deux méthodes, c'est-à-dire que les souches obtiennent la même caractérisation dans les deux cas (protéinase négative ou positive, ainsi que l'intensité des protéinase positive). Il y a cependant quelques cas où la corrélation n'est pas très bonne. Les souches JB36-24, JB36-26 et RL34-3 sont caractérisées protéinase négative à l'OPA, alors qu'elles sont caractérisées moyennement protéinase positive à l'agar au lait. La souche PJ302-7 est celle qui possède l'activité protéinasique la plus élevée au test d'OPA, alors qu'elle est la sixième plus élevée avec l'agar au lait

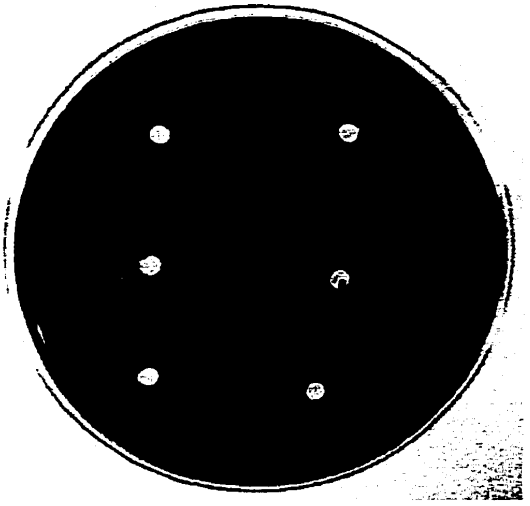


Figure 4: Exemple d'un résultat obtenu par la méthode de l'agar au lait pour la détermination de l'activité protéinasique. Souche NP49-15, peu protéinasique.

D'autres géloses semblables ont été obtenues pour chacune des souches à tester.

Tableau 5: Résultats obtenus pour les différentes souches pour la détermination de l'activité protéinasique par la méthode de l'agar au lait.

Souche bactérienne	Unité trypsine (mg/ml)
LL30-3	**0**
LL30-4	0.71
NP49-2	**0.11**
NP49-15	**0**
NP49-24	**0**
GT41-2	0.38
GT41-16	**0.17**
PA48-6	0.63
PA48-25	0.75
PJ302-7	0.68
PJ201	**0.17**
PJ301	0.40
PJ401	0.48
SL41-5	**0.19**
SL41-18	**0.10**
YG51-25	**0**
PO72-2	1.31
PO72-21	**0.02**
JB36-20	**0.02**
JB36-24	0.84
JB36-26	0.49
RL34-3	0.49
RL34-25	0.96
NM33-1	0.44
NM33-7	0.42
RG70-20	**0**

Tableau 6 : Résultats obtenus au test d'OPA par les différentes souches après fermentation d'un lait à 6 % pour la détermination de l'activité protéinasique.

Souche bactérienne	Concentration de liens NH_2 [a]
LL30-3	**3.94** ± 1.77
LL30-4	33.78 ± 12.37
NP49-2	**1.15** ± 0.15
NP49-15	**0.65** ± 0.24
NP49-24	**0.33** ± 0.23
GT41-2	25.94 ± 0.02
GT41-16	11.76 ± 0.09
PA48-6	59.33 ± 0.09
PA48-25	48.33 ± 2.44
PJ302-7	64.58 ± 5.35
PJ201	8.10 ± 0.23
PJ301	31.20 ± 0.05
PJ401	38.72 ± 0.02
SL41-5	10.53 ± 4.31
SL41-18	**1.55** ± 0.88
YG51-25	**7.70** ± 5.47
PO72-2	**1.28** ± 0.64
PO72-21	**1.04** ± 0.50
JB36-20	14.65 ± 0.27
JB36-24	**1.47** ± 0.61
JB36-26	**1.74** ± 2.27
RL34-3	**0.83** ± 0.73
RL34-25	46.77 ± 1.20
NM33-1	35.83 ± 0.38
NM33-7	25.02 ± 10.20
RG70-20	**4.26** ± 0.68

a Ce sont les moyennes et les écarts types.

Certains chiffres présentés aux tableaux 5 et 6 sont en caractère gras, car ils correspondent à une caractéristique souhaitée pour les souches, c'est-à-dire d'avoir une activité protéinasique faible.

À partir du lait fermenté, nous avons également mesuré l'activité protéinasique par l'analyse des échantillons fermentés sur un gel SDS-PAGE (20%). Comme on peut le voir à la figure 5, la plupart des protéines (caséines et protéines du lactosérum) ont été hydrolysées par les souches, mais à des niveaux différents.

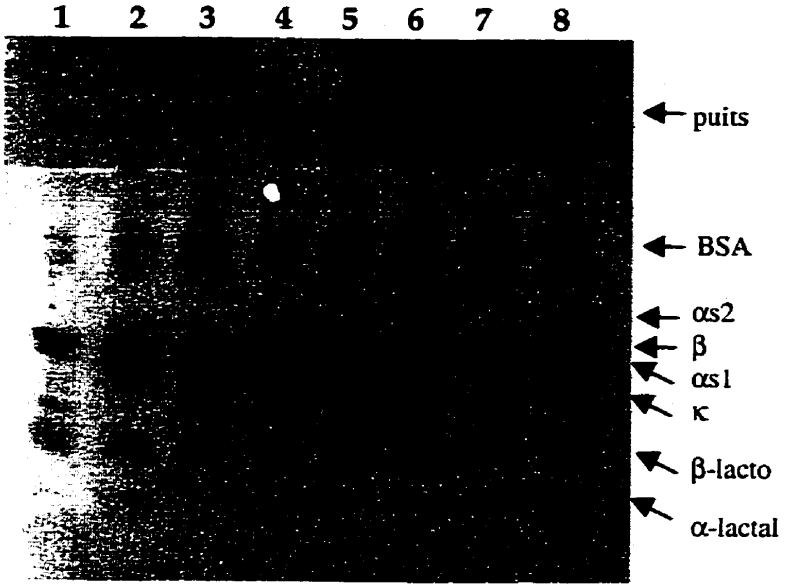
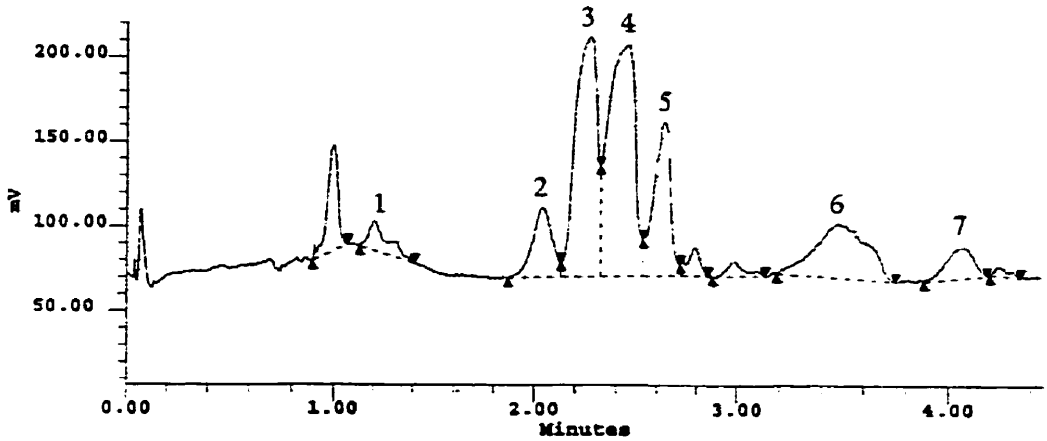


Figure 5 : Gel SDS-PAGE montrant le profil des protéines du lait avant et après fermentation. PJ302-7 après (ligne 1), PJ302-7 avant (ligne 2), PJ201 après (ligne 3), PJ201 avant (ligne 4), PA48-25 après (ligne 5), PA48-25 avant (ligne 6), PA48-6 après (ligne 7) et PA48-6 avant (ligne 8).

Les gels obtenus sont ensuite lus à l'ultroscan pour pouvoir quantifier l'hydrolyse des protéines (caséines et protéines du lactosérum). Des électrophorégrammes sont produits avec lesquels l'aire sous la courbe avant et après fermentation est évaluée pour chaque protéine. Avec ces données, le pourcentage d'hydrolyse des protéines peut être calculé.

A



B

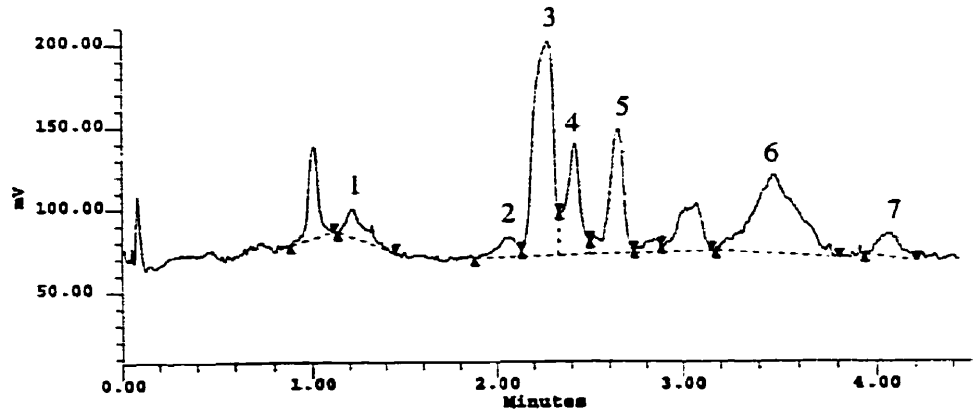


Figure 6 : Électrophorégrammes obtenus avec la souche PA48-25 avant (A) et après (B) fermentation. Pic 1 (BSA), pic 2 (caséine αs2), pic 3 (caséine αs1), pic 4 (caséine β), pic 5 (caséine κ), pic 6 (β-lactoglobuline) et pic 7 (α-lactalbumine).

Tableau 7 : Détermination de l'activité protéinasique par la mesure du % d'hydrolyse des protéines du lait à partir d'une électrophorèse sur SDS-PAGE.

	% d'hydrolyse des différentes protéines							
Souche	**Cas. αs1**	**Cas. αs2**	**Cas. β**	**Cas. κ**	**BSA**	**α-lactal.**	**β-lacto.**	**P_I/P_{III} [a]**
LL30-3	**0**	75	20	38	5	41	40	P_I
LL30-4	32	100	90	85	80	55	38	P_I
NP49-2	**0**	0	**0**	58	0	0	0	P_{III}
NP49-15	17	80	32	64	52	26	68	P_I
NP49-24	**0**	21	**0**	7	10	54	45	P_I
GT41-2	18	81	43	58	29	21	21	P_I
GT41-16	**4**	51	**6**	8	0	59	8	P_I
PA48-6	10	80	80	78	29	20	34	P_I
PA48-25	11	69	73	29	0	35	0	P_I
PJ302-7	14	84	90	94	46	83	49	P_I
PJ201	**6**	66	**14**	20	50	25	25	P_I
PJ301	**0**	43	63	0	0	0	0	P_I
PJ401	**0**	0	**0**	0	9	22	26	P_I
SL41-5	**0**	0	**10**	68	0	0	23	P_I
SL41-18	**0**	27	**0**	30	32	61	34	P_{III}
YG51-25	**0**	0	**0**	29	11	43	18	P_{III}
PO72-2	11	12	**12**	28	0	0	12	P_{III}
PO72-21	**0**	0	**0**	0	0	14	0	P_I
JB36-20	**0**	0	**8**	100	17	34	14	P_I
JB36-24	10	26	**4**	15	10	24	0	P_{III}
JB36-26	**0**	0	**0**	0	0	0	0	P_I
RL34-3	**0**	0	**0**	0	0	0	0	P_I
RL34-25	**0**	66	100	15	15	50	0	P_I
NM33-1	**0**	77	84	100	0	24	0	P_I
NM33-7	**0**	0	64	0	0	5	20	P_I
RG70-20	**0**	0	**0**	0	72	0	0	P_I

a Protéinase de type P_I = ratio d'hydrolyse de αs1/ β< 1

Protéinase de type P_{III} = ratio d'hydrolyse de αs1/ β> 1 (Boutrou et al., 1998)

Le tableau 7 présente les résultats obtenus par analyse de l'activité protéinasique sur SDS-PAGE. Certaines valeurs sont présentées en caractère gras, car elles correspondent à une caractéristique recherchée, qui est d'avoir des souches qui hydrolysent peu les caséines αs1 et β. En effet, il a été suggéré que l'apparition d'amertume dans les produits laitiers soit due à la présence de peptides hydrophobes provenant essentiellement des extrémités C-terminale de la caséine β et N-terminale de la caséine αs1. Lors de la sélection des souches, on recherchera donc des souches protéinase négative, mais plus particulièrement des souches qui hydrolysent peu ces deux caséines. Plusieurs souches (NP49-2, NP49-24, GT41-16, PJ201, PJ401, SL41-5, SL41-18, YG51-25, PO72-21, JB36-20, JB36-24, JB36-26, RL34-3 et RG70-20) répondent à cette caractéristique.

Le pourcentage d'hydrolyse des caséines αs1 et β est de plus utilisé pour connaître le type de protéinase de la souche en faisant le ratio de αs1 sur β. Lorsque le pourcentage d'hydrolyse de ces deux caséines est zéro (NP49-2, NP49-24, PJ401, SL41-18, YG51-25, PO72-21, JB36-26, RL34-3 et RG70-20), on peut regarder le pourcentage d'hydrolyse de la caséine κ. Les souches de type P_{III} hydrolysent plus la caséine κ que celles de type P_I. On obtient, ici, une majorité de souches de type P_I. La caséine αs2 étant présente en très faible quantité, son hydrolyse ne pose pas trop de problèmes d'amertume. La caséine κ, elle, est présente sous une autre forme dans le fromage (paracaséine κ), suite a son hydrolyse par la chymosine, donc un pourcentage d'hydrolyse élevé de cette caséine obtenu au test de SDS-PAGE ne présente pas non plus de problèmes pour un éventuel développement de mauvaises saveurs. Comme les protéines du lactosérum sont peu présentes dans le fromage les résultats de leur hydrolyse par les bactéries lactiques sont moins intéressants. Ils nous montrent cependant que ces protéines sont autant susceptibles d'être hydrolysées que les caséines.

2.5.2 Activité autolytique :

Après solubilisation des protéines du lait, l'autolyse des souches est suivie pendant 24 heures. L'autolyse est effectuée dans un tampon NaH_2PO_4 0.1 M + NaCl 0.5 M, pH 5.2. Les variations d'autolyse obtenues entre les souches, après 24 heures, sont très grandes. Par exemple, la souche PA48-6 possède un pourcentage d'autolyse de 13.6 % après 3 heures, alors que la souche LL30-3, a pour le même temps, un pourcentage de 40.0 %.

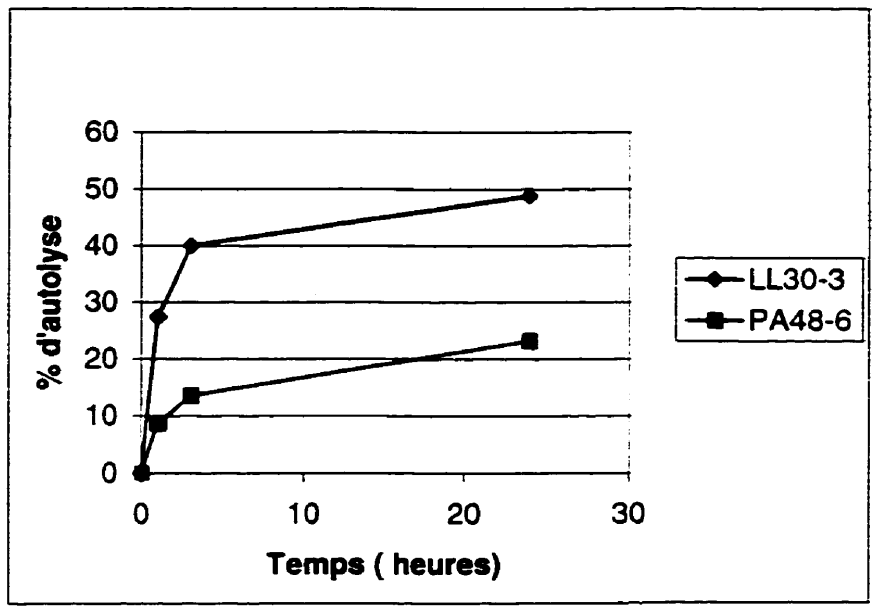


Figure 7 : Suivi du % d'autolyse des souches LL30-3 et PA48-6 pendant 24 heures.

La vitesse d'autolyse est également très différente d'une souche à une autre. La souche RL34-3 montre des pourcentages d'autolyse de 35.2 % après 1 heure et 37.9 % après 3 heures. La souche PO72-21, elle, a un pourcentage d'autolyse semblable à RL34-3 de 36.4 % après 3 heures, alors qu'après 1 heure son pourcentage d'autolyse est seulement de 19.6 %.

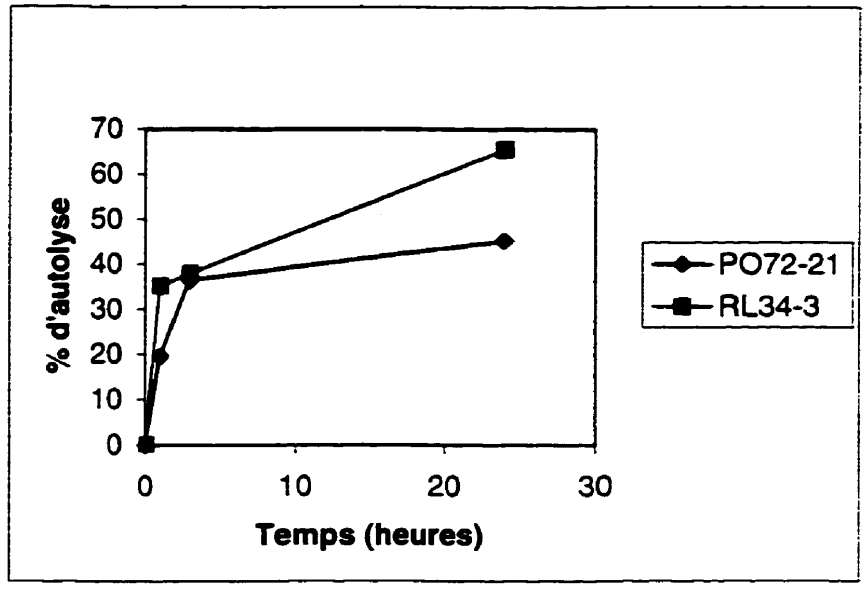


Figure 8 : Suivi du % d'autolyse des souches PO72-21 et RL34-3 pendant 24 heures

Le tableau suivant montre les résultats d'autolyse obtenus pour les différentes souches.

Tableau 8 : Détermination de l'activité autolytique en fonction du temps d'incubation

	% d'autolyse[a]		
Souche	**t = 1h00**	**t = 3h00**	**t = 24h00**
LL30-3	27.4 ± 4.8	40.0 ± 2.7	**48.8** ± 6.2
LL30-4	14.2 ± 2.0	27.4 ± 4.0	**44.1** ± 2.0
NP49-2	13.9 ±6.9	21.7 ± 11.5	32.5 ± 2.2
NP49-15	19.3 ± 0.6	27.5 ± 0.3	**48.7** ± 2.4
NP49-24	21.4 ± 2.0	24.6 ± 1.0	38.5 ± 2.0
GT41-2	23.8 ± 4.2	30.1 ± 5.7	41.2 ± 2.7
GT41-16	11.5 ± 4.1	14.1 ± 0.6	23.0 ± 0.2
PA48-6	8.8 ± 1.0	13.6 ± 1.0	23.2 ± 0.8
PA48-25	13.5 ± 1.5	14.0 ± 2.4	16.2 ± 3.1
PJ302-7	5.7 ± 1.3	7.5 ± 2.9	11.0 ± 0.8
PJ201	1.9 ± 1.0	2.9 ± 0.4	10.4 ± 1.0
PJ301	6.7 ± 1.1	8.6 ± 0.8	15.3 ± 2.5
PJ401	14.5 ± 0.6	21.4 ± 2.8	32.6 ± 1.7
SL41-5	25.2 ± 6.0	31.2 ± 2.9	**49.8** ± 1.9
SL41-18	30.1 ± 1.3	35.0 ± 2.9	**55.9** ± 1.4
YG51-25	16.3 ± 2.0	25.2 ± 3.5	42.4 ± 6.2
JB36-20	16.9 ± 3.5	23.3 ± 3.7	38.8 ± 8.6
JB36-24	18.3 ± 1.8	25.1 ± 0.2	28.4 ± 6.3
JB36-26	10.4 ± 2.0	15.3 ± 1.1	23.9 ± 5.0
PO72-2	16.7 ± 0	25.0 ± 0.5	**50.5** ± 0.3
PO72-21	19.6 ± 5.0	36.4 ± 10.81	**45.2** ± 17.1
RL34-3	35.2 ± 5.52	37.9 ± 4.67	**65.5** ± 11.4
RL34-25	19.8 ± 3.5	24.7 ± 5.1	29.1 ± 10.8
NM33-1	8.4 ± 0.3	16.1 ± 0.3	40.0 ± 6.9
NM33-7	33.1 ± 1.9	37.9 ± 1.0	**74.0** ± 19.2
RG70-20	17.3 ± 3.9	27.3 ± 6.5	**45.9** ± 15.9

a Correspond aux moyennes et écarts types

2.5.3 Activité aminopeptidasique :

L'activité de deux enzymes a été évaluée, soit l'activité de la Pep N (aminopeptidase N), à l'aide du substrat leucine-paranitroanilide (Leu-pNa) et l'activité de la Pep A (aminopeptidase A), à l'aide du substrat glutamyl-paranitroanilide (Glu-pNa). Notre choix s'est tout d'abord arrêté sur la mesure de l'activité de la Pep N, car cette enzyme est considérée comme étant une enzyme désamérisante. Les souches possédant une forte activité aminopeptidasique pour la Pep N sont donc recherchées. Une forte activité pour l'aminopeptidase A est aussi souhaitée, car sa présence est reliée au développement d'un fromage ayant une forte intensité Cheddar.

Le relâchement du composé paranitroanilide, suite à la coupure du lien entre le substrat et l'acide aminé par l'aminopeptidase, est suivi par dosage au spectrophotomètre à 420 nm (couleur jaune).

Avec la leucine, des variations de densité optique allant de 0.33 (souche PO72-2) à 1.24 (souche NP49-15) ont été obtenues après 24 heures d'incubation à 30°C. Les résultats pour les différentes souches sont présentés dans le tableau ci-dessous. Plusieurs souches ont obtenu un résultat élevé très intéressant, comme NP49-15, NP49-24, PA48-6, PJ302-7 et PJ201.

Tableau 9 : Mesure de l'activité de l'aminopeptidase N à l'aide d'un substrat chromogène : la leucine-pNa, pendant 24 heures.

	Variation de la densité optique à 420 nm [a]	
Souche	**t = 2h30**	**t = 24h00**
LL30-3	0.141 ± 0.002	0.725 ± 0.033
LL30-4	0.095 ± 0.011	0.469 ± 0.004
NP49-2	0.109 ± 0.013	0.703 ± 0.057
NP49-15	0.154 ± 0.014	**1.244** ± 0.002
NP49-24	0.219 ± 0.002	**1.216** ± 0.001
GT41-2	0.047 ± 0.000	0.577 ± 0.019
GT41-16	0.056 ± 0.002	0.472 ± 0.016
PA48-6	0.096 ± 0.002	**1.105** ± 0.018
PA48-25	0.251 ± 0.016	**0.950** ± 0.018
PJ302-7	0.191 ± 0.013	**1.034** ± 0.008
PJ201	0.233 ± 0.009	**1.096** ± 0.011
PJ301	0.050 ± 0.001	0.352 ± 0.029
PJ401	0.036 ± 0.002	0.339 ± 0.022
SL41-5	0.078 ± 0.004	0.711 ± 0.028
SL41-18	0.073 ± 0.050	0.557 ± 0.017
YG51-25	0.050 ± 0.014	0.484 ± 0.064
PO72-2	0.020 ± 0.002	0.328 ± 0.002
PO72-21	0.047 ± 0.029	0.571 ± 0.245
JB36-20	0.075 ± 0.007	0.602 ± 0.044
JB36-24	0.075 ± 0.007	0.656 ± 0.042
JB36-26	0.030 ± 0.014	0.427 ± 0.138
RL34-3	0.070 ± 0.014	**0.896** ± 0.165
RL34-25	0.020 ± 0.002	**0.806** ± 0.001
NM33-1	0.226 ± 0.032	0.753 ± 0.076
NM33-7	0.052 ± 0.044	0.562 ± 0.279
RG70-20	0.004 ± 0.001	0.281 ± 0.110

a Correspond aux moyennes et écart types.

Avec l'acide glutamique, des différences marquées entre les souches ont été observées après 48 heures d'incubation, mais surtout après 72 heures. Les valeurs de variation de densité optique obtenues se situent pour la plupart autour de 0.05 à 0.30, mais certaines souches se démarquent avec des valeurs plus élevées de 0.5, 0.6 et même 1.2. Le tableau ci-dessous montre les valeurs obtenues pour les différentes souches avec le substrat Glu-pNa pour la mesure de l'activité de l'aminopeptidase A.

Tableau 10 : Résultats obtenus par les différentes souches pour l'activité de l'aminopeptidase A mesurée à l'aide du substrat Glu-pNa pendant 72 heures.

	Variation de la densité optique a 420 nm[a]		
Souche	**t = 24h00**	**t = 48h00**	**t = 72h00**
LL30-3	0.012 ± 0.007	0.073 ± 0.014	0.150 ± 0.033
LL30-4	0.017 ± 0.001	0.066 ± 0.002	0.116 ± 0.005
NP49-2	0.003 ± 0.001	0.022 ± 0.000	0.065 ± 0.002
NP49-15	0.010 ± 0.004	0.063 ± 0.017	0.141 ± 0.045
NP49-24	0.065 ± 0.018	0.175 ± 0.044	**0.372** ± 0.073
GT41-2	0.039 ± 0.027	0.195 ± 0.083	**0.469** ± 0.022
GT41-16	0.017 ± 0.011	0.058 ± 0.023	0.115 ± 0.051
PA48-6	0.024 ± 0.027	0.253 ± 0.003	**0.558** ± 0.030
PA48-25	0	0.041 ± 0.037	0.137 ± 0.011
PJ302-7	0.004 ± 0.001	0.025 ± 0.000	0.050 ± 0.004
PJ201	0	0.023 ± 0.002	0.076 ± 0.006
PJ301	0	0.043 ± 0.007	0.087 ± 0.011
PJ401	0.002 ± 0.002	0.034 ± 0.048	0.088 ± 0.078
SL41-5	0	0.051 ± 0.042	0.154 ± 0.094
SL41-18	0.001 ± 0.001	0.069 ± 0.008	0.185 ±0.016
YG51-25	0.012 ± 0.017	0.075 ± 0.105	0.165 ± 0.233
PO72-2	0.084 ± 0.002	0.534 ± 0.004	**1.282** ± 0.100
PO72-21	0.096 ± 0.045	0.311 ± 0.168	**0.605** ± 0.379
JB36-20	0.018 ± 0.008	0.092 ± 0.026	0.210 ± 0.048
JB36-24	0.049 ± 0.004	0.282 ± 0.018	**0.634** ± 0.044
JB36-26	0.018 ± 0.025	0.138 ± 0.194	**0.349** ± 0.494
RL34-3	0.024 ± 0.021	0.151 ± 0.033	**0.371** ± 0.029
RL34-25	0.023 ± 0.004	0.097 ± 0.005	0.224 ± 0.005
NM33-1	0.004 ± 0.006	0.043 ± 0.061	0.075 ± 0.103
NM33-7	0	0.033 ± 0.013	0.120 ± 0.057
RG70-20	0.022 ± 0.030	0.126 ± 0.060	0.396 ± 0.280

a Correspond aux moyennes et écarts types.

2.5.4 Résistance aux phages :

La résistance aux phages est une autre caractéristique très importante, car l'utilisation de souches sensibles peut résulter en un échec de la production fromagère, si les phages présents attaquent les souches qui leur sont sensibles. Les résultats obtenus sont les suivant :
(Obtenus de Steve Labrie du laboratoire du Dr. Sylvain Moineau).

Tableau 11 : Résultats de la résistance aux phages pour les différentes souches composant les treize ferments.

Souche bactérienne	Résistance aux phages *
LL30-3	R
LL30-4	S
NP49-2	S
NP49-15	S
NP49-24	R
GT41-2	S
GT41-16	R
PA48-6	R
PA48-25	S
PJ302-7	R
PJ201	R
PJ301	R
PJ401	R
SL41-5	R
SL41-18	R
YG51-25	R
PO72-2	S
PO72-21	S
JB36-20	S
JB36-24	S
JB36-26	R
RL34-3	R
RL34-25	R
NM33-1	S
NM33-7	R
RG70-20	S

*R= résistant
S= sensible

Parmi les souches caractérisées, nous sommes en présence de 15 souches résistantes et de 11 souches sensibles. Lors de la sélection des souches, il sera préférable de sélectionner des souches résistantes plutôt que des souches sensibles pour reconstituer des ferments qui sont résistants aux phages.

2.5.5 Reconstitution de nouveaux ferments :

Les résultats obtenus à la caractérisation des souches serviront à reconstituer de nouveaux ferments lactiques. Les caractéristiques qui sont recherchées sont tout d'abord une activité protéinasique faible, car la présence d'une forte activité a été reliée à la production de peptides amers. Le ferment ne doit cependant pas être seulement composé de souches protéinase négative, car la croissance de celui-ci serait beaucoup trop lente lors de la production fromagère en industrie. On croit même que lors d'une croissance avec un mélange de souches protéinase positive et négative, la souche positive stimulerait les souches négatives et que celles-ci pourraient atteindre un niveau de croissance presque aussi élevé que les souches positives. Une deuxième caractéristique qui est recherchée est d'avoir une activité autolytique élevée afin que les enzymes intracellulaires puissent être relarguées dans la matrice du fromage lors de la maturation et ainsi contribuer au développement de sa saveur. Finalement, on souhaite que les souches possèdent une activité aminopeptidasique élevée, car une corrélation existe entre la présence d'une grande concentration d'acides aminés et le développement d'une bonne intensité fromagère. D'après ces caractéristiques, trois nouveaux ferments ont été formés afin de les tester en production fromagère.

Ferment 1 :

	Protéinase	Autolyse	Act. Amino. (Leu)	Act. Amino. (Glu)	résistance aux phages
Souche NP49-24	Prt -	++	++	++	R
Souche RL34-25	Prt +	+	+	+	R
Souche RL34-3	Prt -	++	+	++	R

On a donc 2 souches protéinase négative pour limiter la protéolyse, mais aussi une souche protéinase positive pour permettre une croissance et une acidification suffisante. Les souches possèdent également toutes de bonnes ou très bonnes activités autolytiques et aminopeptidasiques.

Ferment 2 :

	Protéinase	Autolyse	Act. Amino. (Leu)	Act. Amino. (Glu)	Résistance aux phages
Souche PJ302-7	Prt ++	-	++	-	R
Souche LL30-3	Prt -	++	+	+	R
Souche PO72-21	Prt -	++	++	++	S
Souche PJ201	Prt -	-	+	-	R

Ce ferment est constitué en majorité de souches protéinase négative. La souche PJ302-7 est une souche qui possède une très grande activité protéinasique, mais comme elle possède aussi une très bonne activité pour l'aminopeptidase N elle a quand même été ajoutée au ferment. Les souches LL30-3 et PO72-21 sont des souches qui possèdent de bonnes activités protéinasiques et aminopeptidasiques et qui possèdent en plus une très bonne activité autolytique. Elles sont donc des souches

très intéressantes à utiliser. La souche PO72-21 est sensible aux phages, mais elle est sensible à ceux de l'espèce P335, qui sont très minoritaires dans l'usine d'où proviennent les ferments. La souche PJ201 possède des activités autolytiques et aminopeptidasiques faibles, mais elle est considérée comme étant une souche désamérisante et est souvent ajoutée aux ferments de plusieurs industries.

Ferment 3 :

	Protéinase	Autolyse	Act. Amino. (Leu)	Act. Amino. (Glu)	Résistance aux phages
Souche PJ301	Prt +	+	-	-	R
Souche SL41-5	Prt -	++	++	+	R
Souche PA48-6	Prt +	-	++	++	R

Ce mélange est constitué de plus de souches protéinase positive que de protéinase négative. L'autolyse est surtout prise en charge par la souche SL41-5, qui possède également de bonnes activités aminopeptidasiques. La souche PA48-6 possède également de très bonnes activités aminopeptidasiques, mais elle a un degré d'autolyse faible, ce qui pourrait empêcher les aminopeptidases d'agir. Il faudra voir son comportement avec les autres souches lors de la production fromagère.

2.5.6 Élaboration d'un modèle prédictif

Un des objectifs de l'étude était de créer un modèle prédictif afin de prévoir, d'après les résultats obtenus aux différents tests, quelles souches seraient susceptibles de donner un fromage ayant les caractéristiques désirées.

Comme mentionné précédemment, les caractéristiques qui sont souhaitées pour les souches sont :

Activité protéinasique **faible**
Activité autolytique **élevée**
Activité aminopeptidasique **élevée**

Selon les caractéristiques désirées, on met en place le système de notation qui suit. On suppose que pour obtenir une activité protéinasique faible, la souche doit posséder une activité inférieure à 33 mM au test d'OPA. Cette caractéristique correspond à ce qui est recherché, on accordera donc 1 point à la souche et 0 point si son activité est supérieure à 33 mM. On a de plus précisé qu'on recherchait des souches qui hydrolysaient peu les caséines $\alpha s1$ et β. On accorde donc 1 point de plus à une souche qui hydrolyse peu (<10 %) une des deux caséines et 2 points à une souche qui hydrolyse peu (<10 %) ces deux caséines. Ces résultats sont obtenus à l'aide du SDS-PAGE.

Pour l'autolyse, on souhaite une activité élevée, donc si le % d'autolyse est plus élevé que 35 % on accorde 1 point et s'il est plus faible que 35 % on n'accorde pas de point, soit 0.
Pour l'activité aminopeptidasique on aurait donc :

Leucine : Variation de densité optique plus grande que 0.5 → 1 point
Variation de densité optique plus petite que 0.5 → 0 point

Glutamyl : Variation de densité optique plus grande que 0.3 → 1 point
Variation de densité optique plus petite que 0.3 → 0 point

On souhaite également que les souches soient résistantes aux phages, donc on accordera 1 point pour une souche résistante et 0 point pour une souche sensible.

Tableau 12 : Résumé des valeurs accordées pour chaque activité en vue de la construction d'un modèle prédictif

Test	Caractéristique	Pointage accordé
OPA	< 33 mM	1
	> 33 mM	0
SDS-PAGE	Hydrolyse peu 1 caséine (αs1 ou β)	1
	Hydrolyse peu 2 caséines (αs1 et β)	2
Autolyse	< 35 %	0
	> 35 %	1
Act. Amino. Leu	< 0.5	0
	>0.5	1
Act. Amino Glu	<0.3	0
	>0.3	1
Résistance aux phages	Sensible	0
	Résistant	1

En appliquant ce pointage aux valeurs obtenues par les souches aux différents tests, on obtient le tableau suivant :

Tableau 13 : Valeurs obtenues par les souches pour la construction d'un modèle prédictif servant à reconstituer de nouveaux ferments.

Souche	OPA + SDS	Autolyse	Act amino Leu-pNa	Act amino Glu-pNa	Résistance aux phages	Total des points
LL30-3	1 + 2	1	1	0	1	**6**
LL30-4	0 + 0	1	0	0	0	1
NP49-2	1 + 2	0	1	0	0	**4**
NP49-15	1 + 0	1	1	0	0	3
NP49-24	1 + 2	1	1	1	1	**7**
GT41-2	1 + 0	1	1	1	0	**4**
GT41-16	1 + 2	0	0	0	1	**4**
PA48-6	0 + 0	0	1	1	1	3
PA48-25	0 + 0	0	1	0	0	1
PJ302-7	0 + 0	0	1	0	1	2
PJ201	1 + 1	0	1	0	1	**4**
PJ301	1 + 1	0	0	0	1	3
PJ401	0 + 2	1	0	0	1	**4**
SL41-5	1 + 2	1	1	0	1	**6**
SL41-18	1 + 2	1	1	0	1	**6**
YG51-25	1 + 2	1	0	0	1	5
PO72-2	1 + 0	1	0	1	0	3
PO72-21	1 + 2	1	1	1	0	**6**
JB36-20	1 + 2	1	1	0	0	5
JB36-24	1 + 2	0	1	1	0	5
JB36-26	1 + 2	0	0	1	1	5
RL34-3	1 + 2	1	1	1	1	**7**
RL34-25	0 + 1	0	1	0	1	3
NM33-1	0 + 1	1	1	0	0	3
NM33-7	1 + 1	0	1	0	1	**4**
RG70-20	1 + 2	1	0	1	0	5

Plus le pointage obtenu par une souche est élevé, plus la souche correspond aux caractéristiques qui sont recherchées.

Deux souches ont obtenu un pointage parfait de 7. Il s'agit des souches NP49-24 et RL34-3. De très bons pointages de 6 ont été obtenus par les souches LL30-3, SL41-5, SL41-18 et PO72-21.

Une classification des ferments initiaux en fonction de la qualité du fromage obtenus a déjà été effectuée par Agropur. L'ordre de préférence est le suivant :

Meilleurs ferments :1- PO72
2- JB36
3- NP49
4- PJ101
5- LL30
6- GT41
7- SL41
8- RL34

Ferments moyens : 9- PJ302
10- PA48
11- YG51

Moins bons ferments : 12- NM33
13- RG70

On qualifie certains ferments de moins bons, car ils ne produisent pas un fromage ayant la saveur recherchée dans le temps désiré. On remarque que les souches qui ont obtenu les plus hauts pointages font parties des meilleurs ferments. Ceci est peut-être une indication à l'effet que les caractéristiques recherchées sont effectivement celles que doivent avoir les souches pour produire un fromage ayant la saveur voulue. Les fromages qui ont été reconstitués ont donc de grandes chances de donner du bon fromage, car ils sont constitués en grande partie de bonnes souches d'après le modèle.

En effet, le ferment 1 est constitué des deux meilleures souches (NP49-24 et RL34-3) et d'une souche ayant obtenu un pointage de 3 (RL34-25). Le ferment 2, lui, est composé de deux souches ayant obtenu un pointage de 6 (LL30-3 et PO72-21), d'une souche avec 4 points (PJ201) et d'une souche avec 2 points (PJ302-7). Comme mentionné précédemment, la souche PJ302-7 est une souche très protéinasique, associée avec trois souches protéinase négative. Il sera intéressant de voir son comportement dans le mélange. Le ferment 3, lui, est constitué d'une souche de 6 points (SL41-5) et de deux souches de 3 points (PA48-6 et PJ301).

DISCUSSION

Activité protéinasique

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une grande diversité aussi bien qualitative que quantitative de l'activité protéinasique entre les souches d'une même espèce. La méthode de l'agar au lait est une façon simple et rapide de mesurer l'activité protéinasique des bactéries lactiques, bien qu'il soit parfois difficile de mesurer précisément l'auréole formée par la souche bactérienne. Les résultats qui ont été obtenus avec la méthode de l'agar au lait corrèlent bien, dans la plupart des cas, avec ceux qui ont été obtenus au test d'OPA, puisqu'une souche caractérisée protéinase faible ou élevée avec l'agar au lait obtient la même caractérisation au test d'OPA. L'utilisation de la méthode de l'OPA pour la mesure de l'activité protéinasique des souches est à privilégier, car cette méthode est plus pratique et simple que d'autres (ex : ninhydrine, TNBS, fluorescamine). La méthode qui nous donne cependant les résultats les plus précis et complets de l'activité protéinasique d'une souche est sans contredit le SDS-PAGE, puisque cette méthode nous permet d'estimer le pourcentage d'hydrolyse de chacune des protéines laitières. Le SDS-PAGE permet également de savoir si la souche possède une protéase de paroi de type P_I ou P_{III} (ratio $\alpha s1/\beta < 1 = P_I$; $\alpha s1/\beta > 1 = P_{III}$) (Boutrou et al., 1998) . Ces données nous permettent donc d'obtenir une caractérisation beaucoup plus complète de l'activité protéinasique de la souche.

On a pu observer une relation entre le type de protéase que possède la souche et son degré d'activité protéinasique. En effet, les souches possédant une protéase de type P_I possèdent pour la plupart une activité protéinasique élevée, alors que les souches possédant une protéase de type P_{III} possèdent une activité protéinasique faible. La majorité (81 %) des souches qui ont été caractérisées dans cette étude possèdent une protéinase similaire au type P_I. Il y aurait donc une majorité de

souches de type P_I chez les souches industrielles. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Boutrou et al., (1998) et Bruinenberg et Limsowtin, (1995). Parce que les souches de type P_I hydrolysent préférentiellement la caséine β, elles ont tendance à produire plus de peptides amers que les protéinases de type P_{III} (Bruinenberg et Limsowtin, 1995). Lors de la reconstitution de nouveaux ferments, on recherchera que ceux-ci soient composés en majorité de souches de type P_{III}, afin d'éviter une protéolyse trop importante et le développement de peptides amers.

Activité autolytique

Les résultats obtenus nous montrent que l'activité autolytique n'est pas directement corrélée avec les activités protéinasiques et aminopeptidasiques, puisqu'une souche peut par exemple posséder une activité autolytique élevée, mais avoir une activité aminopeptidasique faible. Les activités sont donc indépendantes les unes des autres. Les pourcentages d'autolyse obtenus après 24 heures d'incubation varient grandement entre les souches. En effet, l'activité autolytique des 26 souches varie d'un facteur 8. On a vu également que la vitesse d'autolyse varie beaucoup d'une souche à une autre (voir figure 8). Boutrou et al., (1998) ont également observé différents groupes de bactéries tant au niveau de la rapidité que de l'intensité de l'autolyse. Ceux-ci ont effectué l'autolyse dans un tampon pendant 30 jours, bien qu'ils notent qu'une période d'incubation de 2 semaines soit suffisante pour prédire le potentiel d'autolyse de la souche. La méthode utilisée dans notre étude est avantageuse, car le temps d'incubation utilisé n'est que de 24 heures et une bonne comparaison entre les souches peut être effectuée.

Activité aminopeptidasique

La présence de l'activité de la Pep N et de la Pep A a été évaluée à l'aide des substrats Leu-pNa et Glu-pNa. Cette activité est très importante, car c'est grâce aux peptidases que les peptides amers peuvent être hydrolysés et ainsi éviter la présence

de mauvaises saveurs dans le fromage. Pour les souches testées, l'activité de la Pep N varie d'un facteur 4. L'activité de la Pep A varie beaucoup plus que celle de la Pep N, soit d'un facteur 12 si on exclue la souche PO72-2 qui a une valeur beaucoup plus élevée que les autres (variation de D.O. de 1.282). On remarque également que les résultats qui ont été obtenus pour la Pep N sont plus élevés que ceux pour la Pep A pour un même temps d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lee et al., (1996), qui ont classé l'activité de la Pep N relativement élevée et l'activité de la Pep A faible.

Résistance aux phages

La mesure de la résistance aux phages est un des critères les plus importants, car cette caractéristique est directement reliée à la réussite ou non de la production fromagère. Une souche peut posséder toutes les caractéristiques recherchées au niveau des activités protéolytiques et autolytiques, mais si elle est sensible aux phages, elle n'aura pas l'occasion d'exprimer ces caractéristiques. Il est donc souhaité de ne pas combiner des souches qui sont sensibles à la même famille de phages pour qu'il reste des souches actives pouvant mener à terme la production en cas de contamination phagique.

Dans cette étude, 15 souches sont résistantes alors que 10 souches sont sensibles. Les souches LL30-4, NP49-15, GT41-2, RG70-20 et JB36-20 sont sensibles aux phages de l'espèce 936. Les souches NP49-2, PA48-25, NM33-1 et PO72-2 sont sensibles aux phages de l'espèce C2. Une seule souche est sensible aux phages de l'espèce P335, soit PO72-21. Les souches sensibles n'ont pas été utilisées lors de la construction des nouveaux ferments, afin d'éviter le plus possible la contamination des essais fromagers. Seule la souche PO72-21 a tout de même été utilisée, car l'espèce de phages P335 est pratiquement absente de la compagnie en question.

Reconstitution de nouveaux ferments

Les diverses activités évaluées sont de très bons indices afin de recomposer de nouveaux ferments. Les nouveaux ferments semblent, de plus, pouvoir donner des fromages de bonne qualité si on se fie aux pointages obtenus par les souches à l'aide du modèle prédictif proposé. Les ferments 1 et 2 seraient les plus susceptibles de donner un bon fromage, car si on additionne le pointage obtenu par chaque souche, on obtient des valeurs de 17 et 16 respectivement sur un maximum de 21 points. Comme le ferment 2 est constitué de 4 souches plutôt que de 3, seulement les 3 souches possédant les meilleurs pointages ont été utilisées dans le calcul. Le ferment 3 serait théoriquement un peu moins bon que les deux autres, puisqu'il obtient un total de 12 points.

Nous observons donc que même au sein d'une même espèce, il existe de grandes variations entre les souches autant au niveau de l'activité protéinasique que des activités autolytiques et aminopeptidasiques. La détermination de ces trois activités est cependant un bon outil pour prédire les aptitudes des souches testées à produire un fromage Cheddar ayant les qualités désirées. Les tests utilisés pour évaluer les différentes activités sont simples et rapides et peuvent donc être utilisés par l'industrie fromagère pour la sélection de souches de lactocoques. Le développement d'un modèle prédictif est également un bon outil pour la sélection et le développement de nouveaux ferments ayant de très bonnes aptitudes fromagères. Une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes est donc une approche simple qui peut être très utile à l'industrie, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.

Références

Anonyme a, Fédération Internationale des Laiteries, (1994).

Anonyme b, Producteurs laitiers du Canada, (1994).

Baankreis R., (1992), The role of lactococcal peptidases in cheese ripening, Ph.D. thesis, University of Amsterdam, The Netherlands.

Baankreis R. et Exterkate F.A., (1991), Characterization of a peptidase from *Lactococcus lactis ssp. cremoris* HP that hydrolyse di- and tripeptides containing proline or hydrophobic residues as the aminoterminal amino acid, System. Appl. Microbiol., 14, 317-323.

Bacon C.L., Wilkinson M., Jennings P.V., Ni Fhaolain I. et O'Cuinn G., (1993), Purification and characterization of an aminopeptidase from cytoplasm of *Lactococcus lactis subsp cremoris* AM2, Int. Dairy J., 3, 163-177.

Bacon C.L., Jennings P.V., Ni Fhaolain I. et O'Cuinn G., (1994), Purification and characterization of an aminopeptidase A from cytoplasm of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2, Int. Dairy J., 4, 503-519.

Booth M., Jennings P.V., NiFhaolain I. et O'Cuinn G., (1990a), Prolidase activity of *Lactococcus lactis subsp cremoris* AM2: Partial purification and characterization, J. Dairy Res., 57, 245-254.

Booth M., NiFhaolain I., Jennings P.V. et O'Cuinn G., (1990b), Purification and characterization of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* AM2, J. Dairy Res., 57, 89-99.

Boutrou R., Sepulchre A., Gripon J.C. et Monnet V., (1998), Simple tests for predicting lytic behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese, J. Dairy Sci., 81, 2321-2328.

Bruinenberg P.G. et Limsowtin G.K.Y., (1995), Diversity of proteolytic enzymes among lactococci, Aust. J. Dairy Technol., 50, 47-50.

Brunner J.R., (1977), Milk proteins, Food proteins, Ed. par Whitaker J.R. et Tannenbaum S.R., The AVI Publishing Company, Wesport, Connecticut, 175-208.

Chapot-Chartier M.-P., Nardi M., Chopin M.-C., Chopin A. et Gripon J.-C., (1993), Cloning and sequencing of Pep C, a cysteine aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2, Appl. Environ. Microbiol., 59, 330-333.

Cheftel J.C., Cuq J.L. et Lorient D., (1985), Protéines alimentaires, Techniques et documentation-Lavoisier, Paris, 278-295.

Chopin M.C., (1980), Resistance of 17 mesophilic lactic streptococcus bacteriophages to pasteurization and spray-drying, J. Dairy Res., 47, 131-139.

Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. et Catignac G.L., (1983), Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins, J. Dairy Sci., 66:6, 1219-1227.

Crow V.L., Coolbear T., Gopal P.K., Martley F.G., McKay L.L. et Riepe H., (1995), The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese, Int. Dairy J., 5, 855-875.

Dako E., El Soda M., Vuillemard J.-C. et Simard R.E., (1995), Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria, Food Res. Int., 28:5, 503-509.

Dalgleish D.G., (1989), Caseins, casein micelles and caseinates, J. of the Soc. of Dairy Technol., 42 :4, 91-92.

Davies D.T. et Law A.J.R., (1980), The content and composition of protein in creamery milk in south-west Scotland, J. Dairy Res., 47, 83-90.

Desmazeaud M.J. et Zevaco C., (1977), General properties and substrate specificity of an intracellular soluble dipeptidase from *Streptococcus diacetylactis* , Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 17, 723-736.

Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrel Jr H.M., Harwalkar V.R., Jenness R et Whitney R. McL., (1984), Nomenclature of proteins of cow's milk, Fifth revision, J. Dairy Sci., 67, 1599-1631.

El Soda M. et Desmazeaud, (1982), Les peptides hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium* I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus, L. acidophilus, L. lactis* et *L. bulgaricus*, Can. J. Microbiol., 28, 1181-1187.

Exterkate F.A., De Jong M, De Veer G.J.C.M. et Baankreis R., (1992), Localization and characterization of aminopeptidase N in *Lactococcus lactis subsp cremoris* HP, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 46-54.

Exterkate F.A., Alting A.C. et Bruinenberg P.G., (1993), Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region, Appl. Environ. Microbiol., 59, 3640-3647.

Foucaud C., Kunji E.R.S., Hagting A., Richard J., Konings W.N., Desmazeaud M. et Poolman B., (1995), Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides, J. Bacteriol., 177, 4652-4657.

Fox P.F., (1983), The milk protein system, Research in food science and nutrition, 5, 117-202.

Fox P.F., (1987), Cheese : Chemistry, physics and microbiology, volume 1, General aspects, Elsevier Applied Science, New-York.

Fox P.F., (1989), Proteolysis during cheese manufacture and ripening, J. Dairy Sci., 72, 1379-1400.

Fox P.F., (1993), Cheese :Chemistry, physics and microbiology, 2e édition, Chapman & Hall, New-York.

Fox P.F. et Law J., (1991), Enzymology of cheese ripening, Food Biotechnol., 5, 239-262.

Fox P. F. et McSweeney P.L. H., (1996), Proteolysis in cheese during ripening, Food Rev. Int., 12:4, 457-509.

Fox P.F., O'Connor T.P., McSweeney P.L.H., Guinee T.P. et O'Brien N.M., (1996), Cheese : Physical, chemical, biochemical and nutritional aspects, Adv. Food Nutr. Res., 39, 163-328.

Gonzales T. et Robert-Baudouy J., (1996), Bacterial aminopeptidases: Properties and functions, FEMS Microbiol. Rev., 18, 319-344.

Grappin R., Rank T.C. et Olson N.F., (1985), Primary proteolysis of cheese proteins during ripening, J. Dairy Sci., 68, 531-540.

Juillard V., Le Bars D., Kunji E.R.S., Konings W.N., Gripon J.C. et Richard J. (1995), Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3024-3030.

Juillard V., Foucaud C., Desmazeaud M. et Richard J., (1996), Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis* , Lait, 76, 13-24.

Kunji E.R.S., Hagting A., de Vries C.J., Juillard V., Haandrikman A.J., Poolman B. et Konings W.N., (1993), Transport of ß-casein derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*, J. Biol. Chem., 270, 1569-1574.

Law J. et Haandrikman A., (1997), Review article: Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, Int. Dairy Journal, 7, 1-11.

Lawrence et al., (1987), Dans Roissart H. et Luquet F.M., (1994b), Bactéries lactiques :aspects fondamentaux et technologiques, vol. II, Ed. Uriage :Lorica.

Lee K.D., Lo C.G. et Warthesen J.J., (1996), Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from Cheddar cheese with peptidases from *Lactococcus lactis ssp cremoris* SK11, J. Dairy Sci., 79, 1521-1528.

Lortal S., (1995), L'autolyse des bactéries, phénomène clé de l'affinage ?, Process-Rennes, 1111, 61-62.

Mars I. et Monnet V., (1995), An aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* with original specificity, Biochim. Biophys. Acta., 1243, 209-215.

Mierau I., Kunji E.R.S., Venema G. et Kok J., (1997), Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 14, 279-301.

Mills O.E. et Thomas T.D., (1981), Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk, NZJ. Dairy Sci. Technol., 16, 43-55.

Monnet V., Naridi M., Chopin A., Chopin M.C., et Gripon J.-C., (1994), Biochemical and genetic characterization of Pep F, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*, J. Biol. Chem., 269, 32070-32076.

Muir D., (1997), A question of taste, Dairy Industries Int., 62 :12, 29-31.

Olson N.F., (1990), The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor, FEMS Microbiol. Rev., 87, 131-148.

Perennou H., (1997), Coagulants du lait : le statu quo, Revue laitière française, 570, 26-27.

Pritchard G. et Coolbear T., (1993), The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Rev., 12, 179-206.

Rank T.C., Grappin R et Olson N.F., (1985), Secondary proteolysis of cheese during ripening : A review, J. Dairy Sci., 68, 801-805.

Roissart H. et Luquet F. M., (1994a), Bactéries lactiques ; aspects fondamentaux et technologiques, vol I, Ed. Uriage :Lorica.

Roissart H. et Luquet F. M., (1994b), Bactéries lactiques ; aspects fondamentaux et technologiques, vol II, Ed. Uriage :Lorica.

Rothe G.A.L.harboe M.K. et Martiny S.C., (1977), Quantification of milk-clotting enzymes in 40 commercial bovine rennets, comparing rocket immunoelectrophoresis with an activity ratio assay, J. Dairy Res., 44, 73-77.

Slattery C.W., (1976), Review : casein micelle structure ; an examination of models, J. Dairy Sci., 59 :9, 1547-1556.

Smid E.D., Poolman B. et Konings W.N., (1991), A minireview: Casein utilisation by Lactococci, Appl. and Environ. microbiol., 57:9, 2447-2452.

Swaisgood H.E., (1973), The caseins, CRC Critical Reviews in Food Technology, 3, 375-414.

Swaisgood H.E., (1982), Chemistry of milk protein, Developments in dairy chemistry-1, Ed. P.F. Fox, Applied Science Publishers, New-York, p :1-59.

Thomas T.D. et Mills O.E., (1981), Proteolytic enzymes of starter bacteria, Neth. Milk Dairy J., 35, 255-273.

Visser S., (1993), Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor, An overview, J. Dairy Sci., 76, 329-350.

Walstra P. et Jenness R., (1984), Dairy chemistry and physics, John Wiley & Sons, New York, 467 pp.