

ACTION STIMULANTE DES MICROCOQUES CASÉOLYTIQUES SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES THERMOPHILES. MISE EN ÉVIDENCE DE LA NATURE PEPTIDIQUE DES SUBSTANCES STIMULANTES

M. DESMAZEAUD et J.-J. DEVOYOD

avec la collaboration technique de C. AURIAULT

*Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique*

RÉSUMÉ

Parmi 306 souches de microcoques isolées à partir d'échantillons de lait prélevés stérilement à la mamelle, de lait de fromagerie, de lactosérum de fromagerie et de fromages à différents stades de la fabrication, 45 ont une action stimulante vis-à-vis des streptocoques thermophiles en culture dans le lait.

Ces microcoques ont un pouvoir caséolytique important. Les substances stimulantes produites par ces microcoques en culture dans le lait ont été séparées par filtration sur gel et identifiées comme étant des peptides.

Des protéolysats de caséine totale, de caséine α_1 , de caséine β , de caséine κ , de ribonucléase et de glucagon obtenus par action de la protéase neutre d'une souche de microcoque stimulant ont montré une action stimulante comparable à celle obtenue avec des filtrats de culture sur lait de microcoques caséolytiques. Cet effet stimulant est attribué à des peptides de poids moléculaire compris entre 1 000 et 1 500.

INTRODUCTION

La plupart des fromages contiennent une flore microbienne comprenant, en proportion variable, des coques Gram-positifs, catalase-positifs, coagulase-négatifs que l'on désigne communément par le terme de « microcoques ». Ces germes que l'on trouve habituellement dans le lait destiné à la fabrication du fromage proviennent soit de la mamelle, soit du matériel de traite et de fromagerie. On sait aussi que la microflore du lait pasteurisé est constituée en partie de microcoques ayant résisté au traitement thermique (THOMAS *et al.*, 1967). Toutes ces observations montrent qu'en technologie fromagère les levains lactiques se trouvent en présence de microcoques dans le lait de fabrication, que ce lait soit cru ou pasteurisé. Ces microcoques

jouent-ils un rôle important, soit au cours de la fabrication, soit au cours de l'affinage du fromage? RITTER (1959 et 1962) a constaté, par exemple, que les microcoques pouvaient avoir une action stimulante marquée vis-à-vis des lactobacilles utilisés comme levains dans la fabrication du Gruyère.

Dans le présent travail nous avons étudié un certain nombre de souches de microcoques isolées de la mamelle et des produits laitiers. Plusieurs de ces germes présentent une action stimulante marquée vis-à-vis des bactéries lactiques thermophiles, couramment utilisées comme levains en technologie. Nous avons recherché quelle était la nature des substances stimulantes produites par ces microcoques. Le fait que toutes les souches de microcoques stimulants étaient douées de propriétés protéolytiques importantes nous a conduit à comparer les substances stimulantes présentes dans les filtrats de culture sur lait de ces microcoques à celles obtenues par dégradation de la caséine totale et de différentes protéines par une protéase neutre isolée d'une souche de microcoque stimulant (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968 a et b).

MÉTHODES

1. Souches bactériennes

a) *Microcoques.*

Trois cent six souches ont été utilisées dans ce travail. Leur origine est donnée dans le tableau 1. Celles provenant de fromages ont été isolées à différents stades de la fabrication et de la maturation (Gruyère de Comté, Carré de l'Est, Saint-Paulin). Les techniques utilisées pour l'isolement et l'identification des microcoques ont été décrites antérieurement (DEVOYOD, 1969).

b) *Bactéries lactiques thermophiles.*

Les souches des bactéries lactiques thermophiles utilisées dans cette étude étaient les suivantes (numéros de collection C. N. R. Z.) :

Streptococcus thermophilus 7 (= SP), 21, 22, 25, 160 (= TJ), 302 et 310
Lactobacillus lactis 71
Lactobacillus helveticus 32, 65 et 303 (= E 4 A)
Lactobacillus bulgaricus 8 et 36 (= LY 3)
Lactobacillus acidophilus 222

2. Mesure de l'activité stimulante des microcoques en culture associée avec les bactéries lactiques

Pour mesurer l'activité stimulante, on cultivait ensemble les bactéries lactiques et les microcoques et l'on comparait la production d'acide de ces cultures à celle des bactéries lactiques seules. Les cultures étaient faites sur lait reconstitué (100 g de poudre de lait écrémé Spray (Elle et Vire), instantanément soluble, exempte d'antibiotiques, pour 1 000 ml d'eau distillée) chauffé à 90°C pendant 30 minutes. Le lait était inoculé avec 1 p. 100 d'une culture des bactéries lactiques sur lait de 16 heures à 37°C et avec 1 p. 100 d'une culture de microcoques sur lait de 16 heures à 30°C. Après 4 heures d'incubation à 37°C \pm 0,1°C, on mesurait le pH des cultures à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre ou l'on titrait leur acidité par la soude N/10.

Bien que 42°C soit la température optimum pour la mesure de l'activité des bactéries lactiques thermophiles, nous avons effectué les incubations des cultures associées à 37°C de façon à obtenir un meilleur développement des microcoques.

Nous avons également suivi l'acidification des cultures d'une manière continue à l'aide d'un pH-mètre enregistreur Metrohm. De plus, la croissance des microcoques a été suivie par dénom-

brement sur milieu de CHAPMAN, celle des streptocoques thermophiles a été suivie par dénombrement sur milieu de GUSS et DELWICHE (1954) et celle des lactobacilles sur milieu M.R.S. (de MAN *et al.*, 1960).

3. Mesure de l'activité stimulante des filtrats de culture des microcoques

a) Obtention des filtrats de culture des microcoques.

Cultures sur lait.

Les cultures de microcoques sur lait autoclavé à 118°C pendant 20 minutes étaient incubées pendant 72 heures à 30°C puis filtrées sur filtre DURIEUX 3B.

Cultures sur lactosérum.

A 100 ml de lactosérum obtenu par coagulation par la présure du lait reconstitué chauffé à 90°C pendant 30 minutes et additionné de CaCl₂ puis filtration stérilisante, on ajoutait 1 ml d'une culture de 16 heures de microcoques sur lait. La durée d'incubation était de 72 heures à 30°C.

Cultures sur milieu à la caséine.

La caséine de vache préparée par précipitation à pH 4,6 par l'acide chlorhydrique N/10 selon la méthode d'HAMMARSTEN était mise en solution dans de l'eau et amenée à pH 7 par la soude N/10. Le milieu de culture était composé de 1 p. 100 de solution de caséine et 0,5 p. 100 de glucose. Il était stérilisé par filtration. A 100 ml de milieu on ajoutait 1 ml d'une culture de microcoques. La durée d'incubation était de 8 jours à 30°C.

Les filtrats des cultures des microcoques sur lait, sur lactosérum et sur milieu à la caséine étaient stérilisés par filtration sur filtre Seitz EKS.

b) Mesure de l'activité stimulante des filtrats de culture.

Pour mesurer l'activité stimulante des filtrats de culture des microcoques, on cultivait les bactéries lactiques dans du lait additionné de 1 p. 100 des différents filtrats ; on comparait la production d'acide de ces cultures à celle des cultures de bactéries lactiques sur lait non additionné de filtrat. Après 4 heures d'incubation à 42°C \pm 0,1°C, on mesurait le pH des cultures ou l'on titrait leur acidité, comme dans le cas des cultures associées.

4. Séparation des substances stimulantes d'un filtrat de culture de microcoques sur lait et d'un protéolysat de caséine totale

a) Filtration sur gel.

Nous avons utilisé indifféremment le Sephadex « medium grade, » préparé en NaCl 0,05M selon la technique décrite par PORATH (1959 et 1960), ou le Bio-Gel P 6 (100-200 mesh) préparé en acide acétique 0,2 M. Par concentration sous vide à 42°C on réduisait de moitié le volume du filtrat de culture ou du protéolysat de caséine totale. Dix ml de filtrat de culture concentré ou 30 ml du protéolysat concentré, étaient déposés au sommet de la colonne puis élués avec de l'acide acétique (1 M dans le cas des colonnes de Sephadex et 0,2 M dans le cas des colonnes de Bio-Gel). Les fractions étaient recueillies au moyen d'un collecteur de fractions Seive ou G.M.E. et analysées par mesure de l'absorption à 280 nm au spectrophotomètre Beckman DU ou à l'Elugraph Seive et par coloration à la ninhydrine selon MOORE et STEIN sur 0,1 ml d'éluat. La quantité de tryptophane était appréciée de façon semi-quantitative par la méthode de FEIGL (1956), de façon quantitative par la méthode de BENCZE et SCHMID (1957). Les autres conditions sont décrites dans la légende des figures 2 et 7.

Les contenus des tubes correspondant à chaque pic d'absorption étaient réunis, desséchés sous vide à 42°C, redissous dans l'eau distillée stérile et redesséchés sous vide à 42°C, l'opération étant répétée 2 fois. A ce stade on a constaté que l'acide acétique était éliminé. Les résidus obtenus étaient conservés à 4°C jusqu'au moment où l'on mesurait l'activité stimulante.

b) Mesure de l'activité stimulante.

Les résidus correspondant aux pics d'absorption étaient dissous dans 10 ml d'eau distillée stérile. Pour mesurer l'activité stimulante de ces solutions, on opérait de la même façon que dans le cas des filtrats de culture sur lait.

c) *Technique bioautographique.*

Cette technique, décrite par SPECK *et al.*, (1958), consiste d'abord à séparer les substances à étudier par chromatographie unidimensionnelle sur papier. Le chromatogramme obtenu est appliqué à la surface du milieu gélosé, contenant un indicateur coloré, ensemencé avec un organisme-test. Après incubation, les zones où l'organisme-test se développe (changement de couleur de l'indicateur) correspondent aux substances stimulantes séparées sur le chromatogramme.

Les résidus séchés correspondant aux pics d'absorption étaient dissous dans 10 ml d'eau distillée stérile. Pour chaque résidu, on disposait sur la ligne de base, sur une feuille de papier Whatman n° 4 de 46 × 57 cm, à des intervalles de 5 centimètres, des portions de 15 microlitres de cette préparation. Le solvant utilisé était le mélange Butanol — Acide acétique — Eau (4:1:5) (v/v). Après développement pendant 16 heures à la température ambiante, le front du solvant se trouvait à 4 cm environ du bas de la feuille. Les chromatogrammes étaient séchés puis découpés en bandes verticales. Les bandes marginales étaient révélées par pulvérisation du réactif à la ninhydrine de MOORE et STEIN et chauffage à 100°C dans une étuve pendant 15 minutes. Les bandes centrales étaient placées sous une sorbonne, à température ambiante, l'élimination du solvant étant réalisée par ventilation pendant 16 heures. Ce sont ces bandes qui servaient à rechercher les substances stimulantes par bioautographie.

Deux cent cinquante ml de gélose nutritive Plate Count Agar Difco n° 479 additionnée d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 concentration finale) étaient fondus, maintenus à 47°C puis ensemencés avec l'organisme-test (*Streptococcus thermophilus* 22 ou 160). Le milieu de culture inoculé était versé dans des boîtes en verre de 300 × 190 × 40 mm. Après solidification du milieu, les bandes de chromatogramme étaient appliquées sur la gélose pendant 10 à 15 minutes, puis étaient retirées. Les boîtes étaient alors mises à incuber à 37°C et examinées à intervalles réguliers pour déceler l'apparition des zones jaunes d'acidification.

5. *Préparation de la protéase neutre d'un microcoque activateur*

La protéase neutre utilisée pour l'obtention des différents protéolysats était obtenue à partir du surnageant de culture à pH 7,0 de la souche de microcoque activateur M 96 (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968 a). La protéase était purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et par chromatographie sur D.E.A.E.-cellulose et sur Sephadex G. 100 selon les techniques décrites précédemment (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968 b). Cette protéase était obtenue en solution dans du tampon *Tris*-(hydroxyméthyle) aminométhane-maléate de sodium 0,005 M à pH 7,0 contenant du chlorure de calcium 0,0015 M. La concentration en protéines était de 371 µg/ml ; son activité spécifique (unités/mg de protéines) était de 2 490. Cette solution était conservée à — 30°C sans perte notable de son activité.

6. *Préparation des hydrolysats de protéines*

Afin de rechercher si les substances stimulantes produites par les microcoques étaient de nature peptidique, nous avons hydrolysé différentes caséines et protéines du lait par la protéase neutre de microcoque stimulant ; les solutions peptidiques ainsi obtenues étaient essayées vis-à-vis des bactéries lactiques. D'autres protéines ont été également hydrolysées ; ces protéines de séquence connue (ribonucléase, lysozyme, insuline, glucagon) nous ont permis de confirmer la nature peptidique des substances stimulantes produites par les microcoques et de montrer l'importance éventuelle de la séquence en acides aminés des peptides stimulants.

a) *Préparation des solutions de protéines.*

La caséine totale, la β-lactoglobuline et l'α-lactalbumine ont été obtenues chez Nutritional Biochemicals Corporation ; la ribonucléase et le lysozyme chez Fluka ; l'insuline et le glucagon chez Calbiochem. Les caséines α_{s1}, B₂ et βB ont été préparées par le Laboratoire de Recherches sur les Protéines (Station centrale de Recherches laitières, C. N. R. Z.).

Les protéines étaient mises en suspension dans l'eau distillée. La concentration finale était 2 p. 100. Le pH était amené à 7,5 par addition de soude N.

b) *Conditions d'hydrolyse.*

A 100 ml de solution de caséine totale on ajoutait 1 ml de la solution de la protéase neutre. L'hydrolyse était effectuée à 30°C. Le pH était maintenu entre 7,45 et 7,55 par addition de soude N/10. L'hydrolyse était suivie par mesure de l'absorption à 275 nm du filtrat après précipitation du mélange réactionnel par l'acide trichloracétique à 6 p. 100 (KUNITZ, 1947).

A 10 ml des solutions de caséine α_{s1} B, α B, β B, de β -lactoglobuline, d' α -lactalbimine, d'insuline, de ribonucléase et de lysozyme on ajoutait 0,1 ml de protéase neutre. L'hydrolyse était effectuée dans les mêmes conditions que ci-dessus, mais elle était suivie par mesure de la coloration à la ninhydrine de 0,1 ml du mélange réactionnel (MOORE et STEIN, 1954).

A 1 ml de la solution de glucagon on ajoutait 10 microlitres de protéase neutre. L'hydrolyse était effectuée et contrôlée par le réactif à la ninhydrine dans les mêmes conditions que ci-dessus.

c) *Préparation des protéolysats.*

Protéolysat de caséine totale.

Au bout de différents temps d'incubation on prélevait 9 ml du mélange réactionnel auxquels on ajoutait goutte à goutte 1 ml d'acide acétique 2 N afin d'inactiver la protéase et de précipiter les molécules de caséine non hydrolysées. Après 4 heures de contact à température ambiante, le précipité était éliminé par centrifugation à 30 000 g pendant 20 minutes. Les surnageants étaient desséchés sous vide à 42°C.

Protéolysat des protéines autres que la caséine totale.

A l'hydrolyse maximum, les enzymes étaient inactivés par chauffage du mélange réactionnel à 100°C pendant 5 minutes. Celui-ci était refroidi et son pH était amené à 6,5. Ces solutions étaient conservées à — 30°C jusqu'à leur utilisation.

d) *Mesure de l'activité stimulante des protéolysats.*

Pour mesurer l'activité stimulante des protéolysats, on opérait de la même façon que dans le cas des filtrats de culture de microcoques sur lait.

RÉSULTATS

1. *Microcoques stimulants — Bactéries lactiques stimulées*

On considérait que les souches de microcoques essayées étaient stimulantes lorsqu'en association avec les bactéries lactiques, le pH des cultures était inférieur d'au moins 0,5 unité à celui des cultures de bactéries lactiques seules. Dans le cas où le pH des cultures associées était supérieur d'au moins 0,5 unité au pH des cultures de bactéries lactiques, les souches de microcoques étaient considérées comme inhibitrices. Dans les conditions expérimentales utilisées, les microcoques ne modifiaient pas le pH du lait.

Parmi les bactéries lactiques essayées, seules les souches de *Str. thermophilus* se sont montrées sensibles à l'action stimulante ou inhibitrice des microcoques, les lactobacilles n'étant ni stimulés, ni inhibés.

Sur les 306 souches de microcoques, 45 (soit 15 p. 100) avaient une action stimulante, 20 (soit 7 p. 100) avaient une action inhibitrice et 241 ne présentaient aucune action, stimulante ou inhibitrice. Le tableau 1 donne la répartition des souches stimulantes et inhibitrices de microcoques suivant leur origine. Les microcoques stimulants provenant des fromages avaient été isolés à partir d'échantillons prélevés au cours des premiers stades de la fabrication.

Toutes les souches stimulantes manifestaient une forte activité caséolytique : les colonies obtenues sur lait gélosé étaient entourées d'une zone claire de 1 cm de diamètre environ, qui apparaissait après 36 à 48 heures d'incubation. La croissance de ces souches était faible à pH 5 et aucune multiplication ne se produisait à pH 4. Cependant toutes les souches caséolytiques n'étaient pas stimulantes. Nous avons en effet isolé dans des fromages en fin d'affinage des microcoques dont l'action sur la

caséine était différente de celle que nous venons d'indiquer : sur lait gélosé, la zone de clarification autour des colonies était toujours petite et ils ne peptonisaient pas le lait. Ces microcoques n'avaient aucune action stimulante vis-à-vis des streptocoques lactiques thermophiles.

TABLEAU I

Répartition des souches de microcoques stimulantes et inhibitrices, suivant leur origine

Origine	Nombre de souches essayées	Nombre de souches inhibitrices	Souches stimulantes	
			Nombre	% de souches essayées
Lait prélevé stérilement à la mamelle	88	1	13	14,7
Lait de fromagerie	99	0	21	21
Lactosérum	54	0	4	7,4
Caillé à la mise en moules	35	2	7	20
Fromage en cours d'affinage	30	17	0	0
Total	306	20	45	14,7

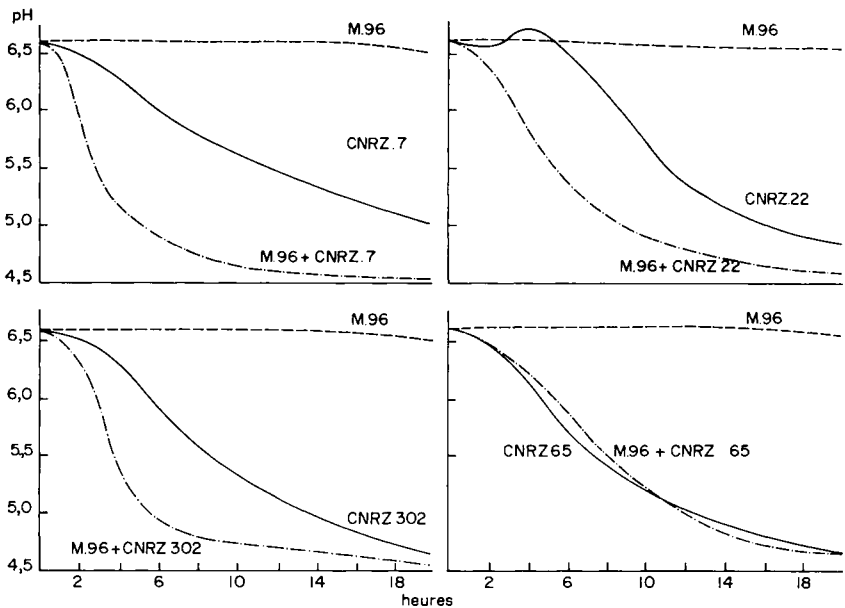


FIG. 1. — Action d'une souche de microcoques caséolytiques sur l'activité des bactéries lactiques thermophiles

Variations du pH en fonction du temps. Inoculum : 1 p. 100 Température d'incubation : 37°C.
 C. N. R. Z. 7, 22 et 302 : *Streptococcus thermophilus* C. N. R. Z. 65 : *Lactobacillus helveticus*
 M. 96 : Microcoque caséolytique.

Pour étudier d'une façon plus précise l'action des microcoques sur la production d'acide des bactéries lactiques thermophiles, nous avons suivi l'évolution du pH des cultures associées. Le travail a été réalisé avec 12 souches de microcoques. La figure 1

montre, à titre d'exemple, les variations de pH observées dans des cultures associées de la souche de microcoque caséolytique M 96 et des souches de *Str. thermophilus* 7, 22 et 302 et de *Lactobacillus helveticus* 65. On voit que pour les cultures associées de *Str. thermophilus* et de microcoques la production d'acide est nettement plus rapide que pour les cultures de streptocoques seuls ; on constate de plus que la quantité maximum d'acide produite reste plus importante dans le cas des cultures associées. On remarque dans le cas de *Str. thermophilus* 22 cultivé seul, une légère remontée du pH au début de la culture ; ce phénomène, non expliqué, est habituel chez cette souche.

Par contre, on voit qu'aucune action, stimulante ou inhibitrice, ne se manifeste dans les cultures associées de *L. helveticus* et de microcoques. Pour les autres souches de microcoques essayées, les courbes obtenues montraient les mêmes caractéristiques.

Compte tenu de la précision des résultats des numérations, on ne peut affirmer si l'augmentation de l'acidité constatée dans le cas des streptocoques thermophiles est due à une augmentation du nombre de ces microorganismes ou à une stimulation de la production d'acide.

2. Action stimulante des filtrats de culture de microcoques

Le tableau 2 montre les résultats obtenus en ajoutant à du lait, chauffé à 90°C pendant 30 minutes, 1 p. 100 des différents filtrats de culture de la souche de micro-

TABLEAU 2

Action des filtrats de culture de la souche de microcoque caséolytique M 96 vis-à-vis de trois souches de Streptococcus thermophilus

Filtrat	<i>Streptococcus thermophilus</i>		
	Souche 22	7	160
Culture sur lait	0,70	0,68	0,81
Culture sur lactosérum	0,08	0,04	0,06
Culture sur milieu à la caséine ...	0,56	0,60	0,65

Les valeurs données correspondent à la différence entre le pH des cultures des streptocoques thermophiles seuls et le pH des cultures ayant reçu 1 p. 100 de filtrat.

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture sur lait de 16 heures à 37°C.

Incubation : 4 heures à 42°C.

coque M 96 (filtrats de culture sur lait, sur lactosérum et sur milieu à la caséine). On voit que seuls les filtrats de culture sur lait et sur milieu à la caséine présentent une action stimulante vis-à-vis des streptocoques thermophiles.

3. Caractérisation des substances stimulantes produites par les microcoques

On a caractérisé les substances stimulantes présentes dans un filtrat de culture sur lait de la souche de microcoque M 96. Ce filtrat de culture a été chromatographié sur Sephadex G-25.

La figure 2 montre la courbe d'élu-tion de ce filtrat de culture. On observe 6 pics d'absorption. Le pic P₁, qui apparaît aussitôt après le passage du volume mort de la colonne, correspond aux protéines et peptides de poids moléculaire supérieur à 5 000. Les pics successifs correspondent à des substances de poids moléculaires de moins en moins élevés. Quant aux pics P₅ et P₆, dont le volume d'élu-tion est supérieur au volume total de la colonne, nous avons vérifié qu'ils contenaient bien des peptides riches en acides aminés aromatiques, ce qui explique leur retard d'élu-tion.

Les différentes fractions correspondant à chaque pic d'absorption ont été réunies et nous avons recherché dans quel pic se trouvaient les substances stimulantes. On voit dans le tableau 3 que les fractions correspondant au pic P₃ ont une action stimulante marquée vis-à-vis des streptocoques thermophiles. Ce pic P₃ correspond à la zone d'élu-tion des substances de poids moléculaire compris entre 1 000 et 1 500.

Bien que les autres pics semblent montrer une légère stimulation, nous nous sommes limités à l'étude du pic P₃ qui donnait la plus forte stimulation.

Le produit obtenu par dessiccation des fractions rassemblées, correspondant au pic P₃, était insoluble dans le chloroforme, l'acétone et l'éthanol absolu ; il était soluble dans HCl N/10 et NH₄OH N/10. Il donnait une réaction positive avec la ninhydrine. Les substances contenues dans les fractions correspondant au pic P₃ sont donc vraisemblablement de nature peptidique.

La figure 3 montre un chromatogramme sur papier du pic P₃. Les fractions correspondant à ce pic contiennent au moins 10 substances distinctes réagissant avec la ninhydrine. Par bioautographie nous avons mis en évidence 4 substances stimulantes coïncidant avec 4 taches ninhydrine-positives (taches hachurées sur le chromatogramme de la figure 3). Les substances stimulantes contenues dans les fractions correspondant au pic P₃ sont donc des peptides.

4. Action stimulante d'un hydrolysât enzymatique de caséine totale

Nous avons étudié l'action stimulante de l'hydrolysât de caséine totale par la protéase neutre de *Micrococcus caseolyticus* M 96. Comme dans le cas des filtrats de culture, parmi les différentes bactéries lactiques thermophiles essayées, seules les souches de *Str. thermophilus* étaient stimulées. La figure 4 montre, à titre d'exemple, les variations de pH des cultures de *Str. thermophilus* 25 et de *L. helveticus* 303 sur lait avec et sans addition de ce protéolysât correspondant à l'hydrolyse maximum. La culture de *Str. thermophilus* supplémentée présente après 2 heures de culture une chute du pH plus rapide que la culture de *Str. thermophilus* seul. La culture supplémentée atteint un pH de 5,5 au bout de 3 heures alors que la valeur du pH de la culture témoin est de 6,1. Pendant toute l'incubation le pH de la culture supplémentée est plus bas. Au bout de 15 heures, la différence est encore de 0,4 unité pH. Par contre, il n'y a aucun effet stimulant sur *L. helveticus*, les valeurs de pH des cultures supplémentées étant égales à celles de la culture témoin.

Comme le montre le tableau 4, toutes les souches de *Str. thermophilus* essayées sont activées par l'hydrolysât enzymatique de caséine totale. En effet la quantité d'acide produite par les cultures supplémentées en protéolysât de caséine totale correspondant à l'hydrolyse maximum est toujours supérieure à la quantité d'acide produite par les cultures de *Str. thermophilus* seules.

On a cherché à voir quelle était l'influence du temps d'hydrolyse de la caséine

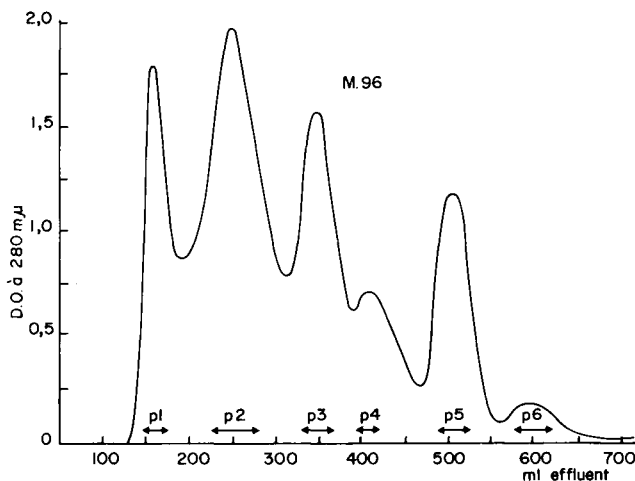


FIG. 2. — Fractionnement sur Sephadex G 25 d'un filtrat de culture sur lait de la souche M 96 de microcoques caséolytiques

Courbe d'éluion mesurée par la densité optique à 280 nm. Vitesse d'éluion 50 ml/heure. Éluant : acide acétique M (pH : 2,5). Volume des fractions : 5 ml. Colonne : 35 mm de diamètre ; 1 000 mm de hauteur.

TABEAU 3

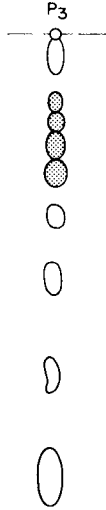
Action stimulante, vis-à-vis des streptocoques thermophiles, des fractions correspondant aux différents pics d'absorption d'un filtrat de culture sur lait de la souche de microcoque M 96. Chromatographie sur Sephadex G 25

Pics d'absorption (Cf. fig. 2)	<i>Streptococcus thermophilus</i>		
	Souche 22	7	160
P ₁	0,05	0,10	0,06
P ₂	0,12	0,13	0,10
P ₃	0,60	0,71	0,68
P ₄	0,17	0,19	0,12
P ₅	0,10	0,12	0,10
P ₆	0,18	0,15	0,19

Les valeurs données correspondent à la différence entre le pH des cultures des streptocoques thermophiles seuls et le pH des cultures ayant reçu 1 p. 100 des différentes fractions.

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture sur lait de 16 heures à 37°C.

Incubation : 4 heures à 42°C.



Front du solvant

FIG. 3. — Chromatogramme sur papier du pic stimulant P 3 de filtrat de culture sur lait de M 96

Papier Whatman n° 4. Solvant Butanol—Acide acétique—Eau (4:1:5) (v/v)
Taches révélées par pulvérisation du réactif à la ninhydrine de MOORE et STEIN.
En grisé : les zones qui correspondent à l'activité stimulante.

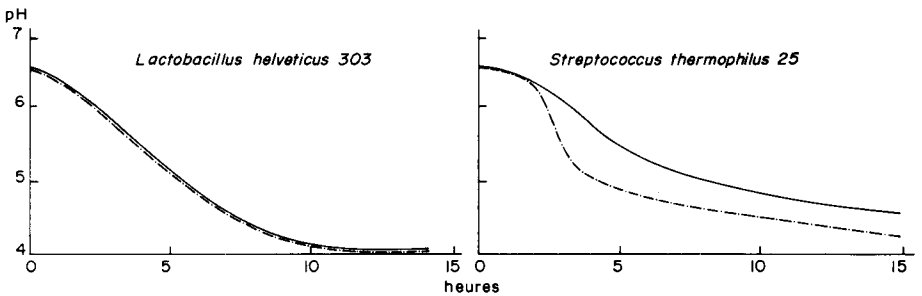


FIG. 4. — Action de l'hydrolysat enzymatique de caséine totale par la protéase neutre du microcoque stimulant M 96, sur l'activité des bactéries lactiques

Variations du pH en fonction du temps. Inoculum 1 p. 100 d'une culture de 16 heures à 37 °C. Les cultures supplémentées ont reçu 1 p. 100 de l'hydrolysat enzymatique de caséine totale. Température d'incubation : 42 °C.

————— : cultures témoins.

- - - - - : cultures supplémentées.

TABLEAU 4

Influence sur différentes souches de *Str. thermophilus* du protéolysat de caséine totale correspondant à l'hydrolyse maximum

	Culture supplémentée Durée d'incubation (en heures)			Culture témoin Durée d'incubation (en heures)		
	4	5	6	4	5	6
<i>Streptococcus thermophilus</i>						
302	50	53	56	22	28	37
160	36	44	50	25	30	34
7	36	46	52	28	36	43
22	22	31	37	19	22	26
25	43	63	68	34	50	60
310	28	43	52	24	34	43
21	40	53	60	27	31	34

Acidité exprimée en degrés Dornic.

Incubation à 42°C.

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture sur lait de 16 heures à 37°C.

Les cultures supplémentées ont reçu 1 p. 100 du protéolysat.

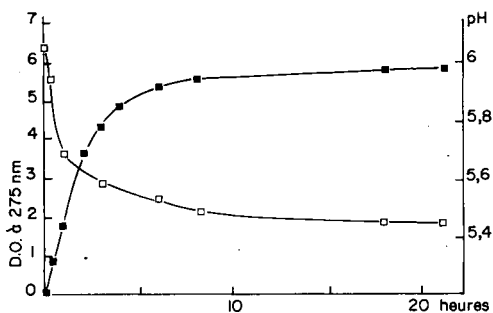


FIG. 5. — Relation entre la durée de l'hydrolyse enzymatique de la caséine totale par la protéase neutre du microcoque stimulant M 96 et l'activité de *Streptococcus thermophilus* 160.

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture de 16 heures à 37°C.

Les cultures sont supplémentées avec 1 p. 100 des protéolysats correspondant aux différents temps d'hydrolyse.

Le pH des cultures est mesuré après 5 heures d'incubation à 42°C.

La protéolyse est estimée par la variation de la densité optique à 275 nm du filtrat trichloracétique.

□—□ pH de la culture sur lait après 5 heures.

■—■ densité optique à 275 nm du filtrat trichloracétique.

totale sur la production de substances stimulantes. La figure 5 montre que la production d'acide de *Str. thermophilus* 160 est de plus en plus importante lorsqu'on ajoute à la culture des protéolysats provenant d'hydrolyses de plus en plus prolongées. On voit que l'action stimulante maximum est obtenue pour l'hydrolyse maximum.

La figure 6 montre l'influence de la concentration en protéolysat, correspondant à l'hydrolyse maximum, sur la production d'acide des 2 souches de *Str. thermophilus*

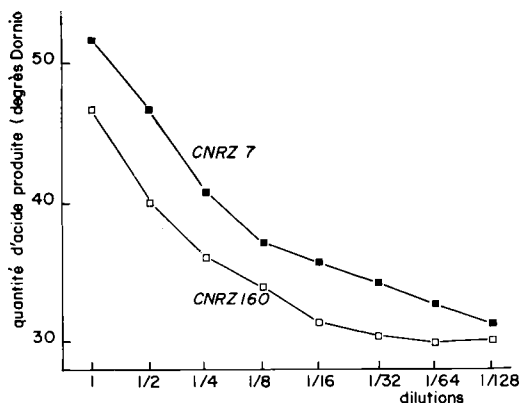


FIG. 6. — Influence de la concentration en hydrolysats enzymatiques de la caséine totale par la protéase neutre du microcoque stimulant M 96 sur l'activité des streptocoques thermophiles

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture de 16 heures à 37°C.

Les cultures sont supplémentées avec 1 p. 100 des différentes dilutions du protéolysat de caséine totale correspondant à l'hydrolyse maximum.

La quantité d'acide produite est exprimée en degrés Dornic.

L'incubation est effectuée à 42°C pendant 5 heures.

7 et 160. Même à la concentration maximum employée, correspondant à 0,4 mg de protéolysat de caséine totale par ml de laitensemencé, on n'atteint pas la stimulation maximum ; en effet, on ne constate pas de phénomène de seuil. On voit que la souche de *Str. thermophilus* 7 est très sensible au phénomène d'activation, puisque celui-ci est encore décelable à une dilution de 1/64.

5. Fractionnement des peptides stimulants

La figure 7 montre les courbes d'élution obtenues à partir du protéolysat de caséine totale correspondant à l'hydrolyse maximum, après chromatographie sur gel. Comme pour le filtrat de culture sur lait du microcoque M 96 chromatographié sur gel, le pic p_1 , qui apparaît aussitôt après le passage du volume mort de la colonne, correspond aux protéines et peptides de poids moléculaire supérieur à 5 000. Le pic p_3 correspond à la zone d'élution des substances de poids moléculaire compris entre 1 000 et 1 500. Le pic p_4 correspond à la zone d'élution des peptides courts ou des acides aminés. Quand aux pics p_5 et p_6 dont le volume d'élution est supérieur au volume total de la colonne, ils contiennent des peptides riches en acides aminés aromatiques. Si l'on compare la courbe d'élution des filtrats de culture sur lait du microcoque M 96 d'une part et celle de l'hydrolysats enzymatique de caséine totale par la protéase neutre de ce microcoque, on constate une différence importante entre les hauteurs relatives des pics correspondants dans les deux courbes. Dans le cas du

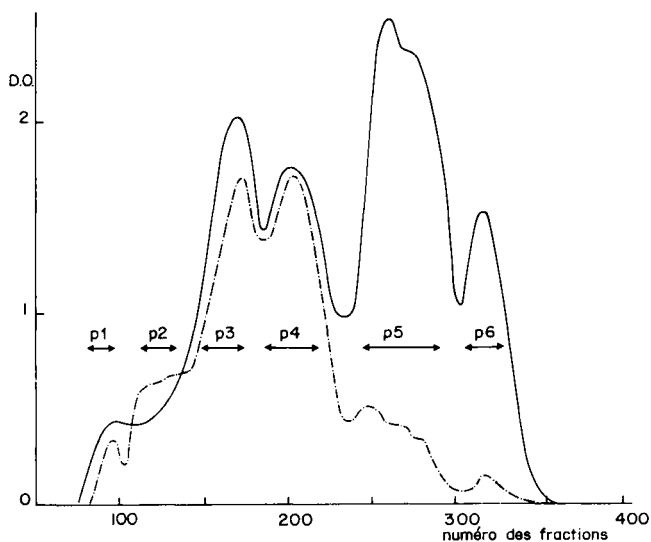


FIG. 7. — Fractionnement sur Bio-Gel P 6 d'un hydrolysât enzymatique de caséine totale par la protéase neutre du microcoque stimulant M 96

Courbes d'élu-tion mesurées par l'absorption en ultra-violet à 280 nm et à 570 nm après coloration par le réactif à la ninhydrine de 0,1 ml d'éluat.

Vitesse d'élu-tion environ 70 ml/heure.

Éluant : acide acétique 0,2 M. Volume des fractions : 10 ml. Colonne : 45 mm de diamètre ; 1 450 mm de hauteur.

— courbe d'élu-tion à 280 nm.

• - - - densité optique à 570 nm après coloration effectuée sur 0,1 ml d'éluat par le réactif à la ninhydrine.

TABEAU 5

Action stimulante, vis-à-vis de Streptococcus thermophilus 160, des fractions correspondant aux différents pics d'absorption d'un protéolysat de caséine totale par la protéase neutre de Micrococcus caseolyticus M 96 après chromatographie sur Bio-Gel P 6

	Culture témoin	Cultures supplémentées avec les fractions correspondant aux pics numérotés						
		en hydro-lysât total	1	2	3	4	5	6
Acidité après 4 h de culture	20	37	19,5	21	35,5	21,5	18,5	21
Acidité après 5 h de culture	27	51	21	34	52,5	30	25,5	25

L'acidité est exprimée en degrés Dornic.

L'incubation est effectuée à 42°C.

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture sur lait de 16 heures à 37°C.

Les cultures supplémentées ont reçu 1 p. 100 des différentes fractions.

protéolysat de caséine totale, les pics contenant les substances de haut poids moléculaire sont plus petits que dans les filtrats de culture sur lait. Ceci indique une hydrolyse plus poussée dans le cas du protéolysat de caséine totale que dans celui des filtrats de culture.

Comme pour le filtrat de culture sur lait, le tableau 5 montre que seules les fractions correspondant au pic p_3 présentaient une action très stimulante vis-à-vis de *Str. thermophilus* 160. Les fractions correspondant aux pics p_2 et p_1 ne présentaient qu'une faible action stimulante, tandis que celles correspondant aux pics p_1 , p_5 et p_6 présentaient une action faiblement inhibitrice. C'est pourquoi, dans le cas des filtrats de culture sur lait la faible action stimulante constatée pour les pics P_1 , P_5 , P_6 , (figure 2) est due sans doute à des substances autres que les peptides de la caséine.

De plus, les chromatographies sur gel des protéolysats de caséine totale correspondant aux différents temps d'hydrolyse, montraient aussi que la stimulation était maximale lorsque le pic p_3 atteignait aussi sa taille maximale.

6. Action stimulante des hydrolysats enzymatiques de protéines autres que la caséine totale

Dans le tableau 6 nous avons porté les différences de densité optique à 570 m μ (après coloration à la ninhydrine) entre les solutions non hydrolysées des protéines du lait et les solutions correspondant à l'hydrolyse maximale. On constate que les protéines du sérum sont plus faiblement hydrolysées que les caséines.

Le tableau 7 donne à titre de comparaison l'acidité produite par des cultures

TABLEAU 6

Activité protéolytique, sur les différentes protéines du lait, de la protéase neutre de *Micrococcus caseolyticus* M 96

	Variation de la densité optique à 570 m μ
Caséine totale	1,90
Caséine $\alpha_{s1}B$	1,70
Caséine βB	1,45
Caséine αB	1,22
α -lactalbumine	0,32
β -lactoglobuline	0,75

Les valeurs données correspondent à la différence entre la densité optique à 570 m μ des solutions non hydrolysées et des solutions correspondant à l'hydrolyse maximale, après coloration par le réactif à la ninhydrine.

La coloration était effectuée par 1 ml du réactif à la ninhydrine sur 0,1 ml du mélange réactionnel dilué dans 0,9 ml d'eau distillée.

Après 15 minutes au bain-marie bouillant, puis refroidissement, on ajoutait 8 ml d'alcool à 50 p. 100.

de *Str. thermophilus* 160 sur lait, après addition des différents protéolysats. Afin de pouvoir comparer leur action stimulante, les différents protéolysats employés correspondaient tous à l'hydrolyse maximale obtenue.

Les hydrolysats de caséine $\alpha_{s1}B$ et de caséine κB présentaient l'effet activateur le plus marqué bien que plus faible que celui de la caséine totale. Les hydrolysats de caséine βB , de ribonucléase et de lysozyme présentaient un effet stimulant plus faible que celui de la caséine $\alpha_{s1}B$. Par contre, les hydrolysats d'insuline, de β -lactoglobuline et d' α -lactalbumine ne présentaient aucun effet stimulant. Quant au glu-

TABLEAU 7

Influence des protéolysats sur l'acidification des cultures sur lait de Str. thermophilus 160

		Acidité après 4 heures de culture (Degrés Dornic)	Acidité après 5 heures de culture (Degrés Dornic)
Culture témoin		28	33,5
Cultures supplémentées	Caséine totale	46	51
	Caséine $\alpha_{s1}B$	37	46
	Caséine βB	31,5	38,5
	Caséine κB	36	45
	β -lactoglobuline	27	31
	α -lactalbumine	29	35
	Ribonucléase	39	41,5
	Insuline	30	34
	Lysozyme	32,5	38
	Glucagon ⁽¹⁾	31	36
⁽²⁾	39	44,5	

(¹) Non hydrolysé.

(²) Après hydrolyse.

L'acidité est exprimée en degrés Dornic.

Inoculum : 1 p. 100 d'une culture sur lait de 16 heures à 37°C.

Incubation à 42°C.

Les cultures supplémentées ont reçu 1 p. 100 des différents protéolysats.

cagon hydrolysé, il présentait un pouvoir activateur marqué, inférieur cependant à celui de l'hydrolysats de caséine $\alpha_{s1}B$. Il faut cependant noter que le glucagon non hydrolysé présentait un léger pouvoir stimulant.

DISCUSSION

Lorsque l'acidité du caillé augmente, les microcoques caséolytiques stimulants disparaissent ; c'est pourquoi nous ne les trouvons qu'au cours des premiers stades de la fabrication. En effet à pH 5 ces microcoques ne se multiplient pas et à pH 4,5 leur nombre diminue rapidement. Le fait que nous n'ayons pas trouvé de souches stimulantes ni dans l'atmosphère des étables ni dans la flore du matériel de traite

(DEVOYOD, résultats non publiés) semble indiquer qu'une partie importante de ces microcoques stimulants est d'origine mammaire.

Il semble bien que l'intensité du pouvoir caséolytique des souches de microcoques soit en relation directe avec leur action stimulante. En effet nos résultats ont montré que les microcoques qui avaient une action stimulante vis-à-vis des streptocoques lactiques thermophiles avaient un pouvoir caséolytique élevé, tandis que les microcoques moins caséolytiques que nous avons isolés d'échantillons de fromages prélevés en fin d'affinage ne stimulaient pas les streptocoques lactiques thermophiles. Nos résultats sont à rapprocher de ceux de PEPPLER (1942) qui a montré que *Str. thermophilus* était activé par des espèces bactériennes très fortement protéolytiques telles que *Str. liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus ammoniae*.

Par contre, nos résultats semblent être en contradiction avec ceux de RITTER (1962) qui observait une activation des lactobacilles et non des streptocoques thermophiles par des souches de microcoques. Il faut toutefois remarquer que les souches utilisées par cet auteur n'appartenaient pas à des espèces fortement caséolytiques. On peut donc penser que l'activation des lactobacilles ne se fait vraisemblablement pas par la même voie métabolique que dans le cas des streptocoques thermophiles.

Nos résultats ont montré que les cultures sur lait des microcoques caséolytiques, comme l'hydrolysate de caséine totale par la protéase neutre d'un microcoque, contenaient des peptides stimulants de poids moléculaire compris entre 1 500 et 1 000. Nos résultats ont montré aussi que les cultures sur lactosérum des microcoques caséolytiques, comme les hydrolysats enzymatiques de β -lactoglobuline et d' α -lactalbumine, ne contenaient pas de substances stimulantes. On peut donc affirmer que la stimulation dans le lait des streptocoques thermophiles par les microcoques caséolytiques est bien due à des peptides provenant de la dégradation des caséines.

Cette action stimulante des peptides de caséine vis-à-vis de *Streptococcus thermophilus* est en accord avec celle déjà observée chez d'autres bactéries, en particulier chez *Str. cremoris* (GARVIE et MABBITT, 1956) ou chez *Lactobacillus casei* (KIHARA et SNELL, 1960 ; MCANELLY et SPECK, 1967 ; BAUDET et CHERBULIEZ, 1960). Cependant, nos résultats ne nous permettent pas encore de conclure si le pouvoir activateur de ces peptides serait bien dû au fait qu'ils agissent comme source d'acides aminés essentiels selon l'hypothèse de TOKITA (1960) et MCLEOD et GORDON (1961).

Puisque plusieurs protéines (ribonucléase, lysozyme et glucagon) peuvent être hydrolysées par la protéase neutre en donnant des peptides stimulants, on peut penser que le pouvoir activateur n'est pas lié à une séquence précise d'acides aminés de ces peptides mais plutôt à un certain poids moléculaire, compris entre 1 000 et 1 500, poids moléculaire des peptides stimulants fractionnés par chromatographie sur gel. Par contre, comme nous l'avons montré par bioautographie, tous les peptides de poids moléculaire compris entre 1 000 et 1 500 ne sont pas stimulants. On peut donc en conclure que la composition en acides aminés de ces peptides est aussi un facteur important dans la stimulation des streptocoques thermophiles par les microcoques caséolytiques.

Enfin, il ne semble pas que la fraction glucidique de la caséine puisse jouer un rôle dans le phénomène d'activation puisque les peptides obtenus par action de la protéase sur des protéines ne contenant pas de fraction glucidique sont aussi stimulants.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. RIBADEAU-DUMAS du Laboratoire de Recherches sur les Protéines (C. N. R. Z.) de nous avoir procuré les caséines α_{s1} , β - et κ -purifiées.

Nos remerciements vont également à MM. HERMIER et AUCLAIR pour leurs suggestions et leurs critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans la réalisation de ce travail et la rédaction du manuscrit.

SUMMARY

STIMULATION OF THERMOPHILIC LACTIC BACTERIA
BY CASEOLYTIC MICROCOCCI
IDENTIFICATION AS PEPTIDES OF THE STIMULATORY SUBSTANCES

45 out of 306 isolated *Micrococcus* strains from various origins (udder milk samples ; milk for cheese making ; milk serum and cheeses at various stages of production) were found to stimulate the activity of thermophilic streptococci.

These *Micrococcus* strains had a high caseolytic activity. The stimulatory substances were separated by gel filtration and identified as peptides.

The activity of thermophilic streptococci was also stimulated by proteolysates of whole casein, α_{s1} -casein, β -casein, κ -casein, ribonuclease and glucagon hydrolyzed by a neutral proteolytic enzyme obtained from a *Micrococcus* caseolytic strain.

The stimulatory effect seems to be due to peptides of 1 000 to 1 500 molecular weight.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAUDET P., CHERBULIEZ E., 1960. Stréptogénines de la caséine. I. Étude de leur libération et de leur purification. *Helvet. Chim. Acta.*, **43**, 904-923.
- BENCZE W. L., SCHMID K., 1957. Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Anal. chem.*, **29**, 1193-1196.
- DESMAZEAUD M., HERMIER J., 1968 a. Facteurs intervenant dans la production du système protéolytique chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 419-429.
- DESMAZEAUD M., HERMIER J., 1968 b. Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 565-577.
- DEVOYOD J.-J., 1969. Flore microbienne du fromage de Roquefort. II. Staphylocoques et microcoques. *Le Lait*, **481-482**, 1-20.
- FEIGL F., 1956. *Spot test in organic analysis.*, 5th ed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, p. 278.
- GARVIE E. I., MABBITT L. A., 1956. Acid production in milk by starter cultures. The effect of peptone and other stimulatory substances. *J. Dairy Res.*, **23**, 305-314.
- GUSS M. L., DELWICHE E. A., 1954. *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, **67**, 714-717.
- KIHARA H., SNELL E. E., 1960. Peptides and bacterial growth. VIII. The nature of streptogenin. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1409-1414.
- KUNITZ M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. gen. Physiol.*, **30**, 291-310.
- MCANELLY J. K., SPECK M. L., 1957. Amino acid content of a peptide stimulatory for *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.*, **73**, 676-681.
- MCLEOD P., GORDON D. F. Jr., 1961. Peptides as sources of essential amino acids for lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, **44**, 237-242.
- DE MAN J. C., ROGOSA M., SHARPE E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135.
- MOORE S., STEIN W. H., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913.

- PEPLER M. J., 1942. The heat resistance of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and certain caseolytic bacteria. *J. Bacteriol.*, **44**, 389.
- PORATH J., 1959. Fractionation of polypeptides and proteins on dextran gels. *Clin. Chim. Acta.*, **4**, 776-789.
- PORATH J., 1960. Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **49**, 193-207.
- RITTER P., 1959. Neue Erkenntnisse über die Gäranlage der Milch. *Schweiz. Milchzeitung*, **85**, 60. *Wissenschaftliche Beilage*, **66**, 521.
- RITTER P., 1962. Beeinflussung der Säuerung der im Emmentalerkäse notwendigen thermophilen Milchsäurebakterien durch fördernde Mikrokokken aus der Milch. *XVI^e Internationaler Milchwirtschaftskongress B IV 2*, 712-720.
- SPECK M. L., McANALLY J. K., WILBUR J. D., 1958. Variability in response of lactic streptococci to stimulants in extracts of pancreas, liver and yeast. *J. Dairy Sci.*, **41**, 702-707.
- THOMAS S. B., DRUCE R. G., PETERS G. I., GRIFFITHS D. G., 1967. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies. A reappraisal and review. *J. appl. Bacteriol.*, **30**, 265-298.
- TOKITA F., 1966. Peptides as amino acid sources for growth of lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, **21**, 220-222.
-