

APTITUDE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES A LA PROTÉOLYSE

II. — ÉTUDE DE L'ACTION DU SYSTÈME PROTÉOLYTIQUE DE *STREPTOCOCCUS LACTIS* SUR LA CASÉINE ENTIÈRE

T. KIKUCHI, J.-L. BERGÈRE * et M.-J. DESMAZEAUD *

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

* *Laboratoire de Biochimie microbienne, I. N. R. A.,
Centre national de Recherches zootechniques
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

L'action du système protéolytique d'une souche de *S. lactis* sur la caséine entière a été caractérisée globalement avec des cellules traitées aux ultrasons.

La température optimale est de 30°C et le pH optimum voisin de 7,0. Dans ces conditions, après 50 h d'incubation, seulement 12 p. 100 de la caséine devient soluble à pH 4,6 et les produits solubles ainsi libérés sont en majeure partie des composés de faible poids moléculaire. En effet, l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique représente 65,8 p. 100 de l'azote soluble à pH 4,6.

Le fractionnement de ces produits d'hydrolyse par filtration sur gel montre qu'ils sont constitués essentiellement de peptides d'une masse moléculaire inférieure à 1 800 daltons et surtout d'acides aminés. L'analyse de ces derniers par chromatographie et électrophorèse sur papier met en évidence de fortes concentrations de sérine, glycine, valine, leucine, isoleucine et proline, et des quantités moindres d'acide aspartique, thréonine, méthionine, phénylalanine et tyrosine.

Ces résultats tendent à montrer que le système protéolytique de *S. lactis* est constitué de peptidases et de protéases de spécificité étroite dont l'action sur la caséine est limitée.

Après avoir mis en évidence la dégradation des protéines du lait par plusieurs souches de différentes espèces de streptocoques lactiques (KIKUCHI, DESMAZEAUD et BERGÈRE, 1973), dans le présent travail, nous étudions sur la caséine entière prise comme substrat, l'action du système protéolytique de la souche de *Streptococcus lactis* CNRZ 261. Parmi les streptocoques lactiques mésophiles, cette souche a été choisie

parce qu'elle appartient à l'espèce qui intervient dans le plus grand nombre de fromages et parce que dans cette espèce c'est celle qui présente la plus grande aptitude à la protéolyse en culture sur lait (KIKUCHI *et al.*, 1973).

Dans ce travail, nous nous sommes attachés spécialement, à étudier le système protéolytique cellulaire puisqu'il apparaît que ce groupe de micro-organismes doit agir surtout par des protéases intracellulaires (DUCASTELLE et LENOIR, 1969 ; BARIBO et FOSTER, 1952 ; VAN DER ZANT et NELSON, 1953 ; SATO et OHMYA, 1966) ; la production de protéases exocellulaires par *S. lactis* n'a d'ailleurs été que rarement signalée (WILLIAMSON, TOVE et SPECK, 1964 ; SASAKI et NAKAE, 1959 ; SMITTLE et KOBURGER, 1968) et la souche utilisée ici ne semble pas en produire.

Or, à part l'étude de la spécificité d'une enzyme du système protéolytique cellulaire de *S. lactis* (COWMAN, YOSHIMURA et SWAISGOOD, 1968) effectuée par hydrolyse de la ribonucléase et de la chaîne B de l'insuline, il n'existe que des données très partielles sur le mode d'action de ces bactéries lactiques sur la caséine. C'est pourquoi, afin de connaître de façon plus précise celui-ci, nous avons recherché la nature des produits formés à partir de la caséine entière soit avec des extraits enzymatiques non purifiés, soit avec des broyats cellulaires complets afin qu'aucune protéase ou peptidase ne soit éventuellement écartée, comme cela pourrait se produire au cours d'une purification même partielle. Ainsi, l'action globale sur la caséine entière, de cette bactérie lactique, servira ultérieurement à établir s'il existe une corrélation entre l'aptitude à la protéolyse des streptocoques lactiques et les observations faites en technologie fromagère.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. 1. — *Organisme*

La souche utilisée dans ce travail est *Streptococcus lactis* CNRZ 261. Elle est maintenue par repiquage sur lait écrémé stérile et conservée par congélation à -30°C .

I. 2. — *Conditions de culture*

Un milieu à base de caséine a été choisi pour la croissance de *S. lactis* principalement en raison de son pouvoir inducteur sur la synthèse des systèmes protéolytiques (WESTHOFF et COWMAN, 1971 *c*). Il avait la composition suivante : caséine entière isoélectrique, qualité Hammarsten (NBC), 10 g ; extrait de levure (Difco), 1 g ; glucose, 20 g ; tampon phosphate 0,1 M pH 6,50, 1 000 ml. Au cours de l'incubation effectuée à 30°C le milieu de culture était constamment agité. Le pH était maintenu à la valeur constante de 6,50 par addition automatique d'une solution de soude 5 N. (BERGÈRE et HERMIER, 1968) 1 500 ml de milieu étaient inoculés avec 15 ml d'une culture en fin de croissance exponentielle effectuée à 30°C dans le même milieu mais sans régulation de pH. La croissance était suivie par mesure de la densité optique de la culture (ou d'une dilution) à la longueur d'onde de 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman B en utilisant une cuve en verre de 1 cm de chemin optique (BERGÈRE, 1968).

I. 3. — *Récolte des cellules*

Les cellules bactériennes étaient recueillies en fin de croissance exponentielle (DO de 2,0 environ) après 19 h de culture, par centrifugation pendant 20 mn à la température de 4°C à 15 000 g. Ce stade de la croissance est celui où l'activité protéolytique des cellules semble la

plus forte. Le surnageant était conservé au congélateur à -30°C . Le culot ainsi obtenu était lavé deux fois avec du tampon phosphate $0,05\text{ M}$ à $\text{pH } 6,50$ et conservé à -30°C avant le broyage.

1. 4. — *Broyage des cellules et traitement au lysozyme*

Les cellules bactériennes correspondant à 400 ml de culture étaient mises en suspension dans 40 ml de tampon phosphate $0,05\text{ M}$ à $\text{pH } 7,0$; puis soumises à l'action des ultrasons dans un appareil Siduse US 77-7 à une fréquence de 23 khz pendant différents intervalles de temps ($10, 20$ ou 30 mn) dans une enceinte réfrigérée à 4°C .

Selon les essais, la suspension de cellules ainsi traitées était utilisée telle quelle ou subissait un traitement au lysozyme et (ou) une centrifugation dont l'ordre d'utilisation est précisé dans les résultats. La centrifugation effectuée à $25\ 000\text{ g}$ pendant 20 mn à 4°C permettait de séparer un surnageant (fraction soluble) et des débris cellulaires qui étaient remis en suspension dans 40 ml de tampon phosphate $0,05\text{ M}$ à $\text{pH } 7,0$. Le traitement au lysozyme était effectué à 37°C pendant 2 h , soit sur les débris cellulaires mis en suspension dans 40 ml de tampon *Tris*- HCl $0,05\text{ M}$ à $\text{pH } 8,0$, soit directement sur la suspension de cellules traitées aux ultrasons. La concentration de lysozyme était de $0,25\text{ mg}$ par ml .

1. 5. — *Mesure de l'activité protéolytique*

1. 51. *Mélange réactionnel et conditions d'hydrolyse.*

Le mélange réactionnel avait la composition suivante : $2,5\text{ ml}$ d'une solution à 2 g de caséine entière isoélectrique qualité Hammarsten (NBC) pour 100 ml de tampon phosphate $0,05\text{ M}$ à $\text{pH } 6,0$; 2 ml de la solution enzymatique ou de sa dilution dans le tampon phosphate $0,05\text{ M}$ à $\text{pH } 6,0$; $0,1\text{ ml}$ d'une solution de merthiolate à $0,075\text{ g}$ pour 100 ml d'eau distillée; $0,4\text{ ml}$ de tampon phosphate $0,05\text{ M}$. Les mélanges réactionnels étaient maintenus à 37°C pendant des temps variables (au maximum 102 h) selon les essais.

1. 52. *Dosage des différentes formes d'azote solubilisé.*

En fin de réaction le mélange réactionnel était déprotéiné selon les techniques suivantes :

1. 521. Par abaissement du pH . Par addition d'une solution d'acide chlorhydrique N , le pH du mélange réactionnel (5 ml) était ajusté à une valeur de $4,60$ et le volume final amené à 10 ml avec de l'eau distillée. Après 16 h de contact à 22°C les protéines précipitées étaient éliminées par filtration sur filtre Durieux n° 111.

1. 522. Par action de l'acide trichloracétique à 2 ou $12\text{ p. } 100$. 5 ml du mélange réactionnel étaient additionnés à 5 ml d'une solution à 4 g ou 24 g d'acide trichloracétique pour 100 ml d'eau distillée; après 16 h de contact les protéines précipitées étaient éliminées par filtration comme décrit ci-dessus.

1. 523. Par action de l'acide phosphotungstique. A 5 ml du mélange réactionnel étaient ajoutés $2,5\text{ ml}$ d'une solution à 4 g d'acide phosphotungstique pour 100 ml d'eau distillée et $2,5\text{ ml}$ d'une solution d'acide sulfurique à $25\text{ p. } 100$ (v : v); après 16 h de contact le précipité était éliminé par filtration comme décrit ci-dessus.

Le tryptophane et la tyrosine libres ou engagés dans des peptides étaient estimés dans les différents filtrats par mesure de la densité optique à 260 nm et 280 nm (KUNITZ, 1947). Les groupements NH_2 — libres étaient dosés par coloration à la ninhydrine : à 1 ml des filtrats (ou de leur dilution) on ajoutait 1 ml du réactif à la ninhydrine selon MOORE et STEIN (1954) et on portait 15 mn au bain-marie bouillant; après refroidissement et dilution par 8 ml d'alcool à $50\text{ p. } 100$ on mesurait la densité optique à 570 nm . L'azote total contenu dans les filtrats était dosé par la méthode Kjeldahl selon PREGL (1939) après minéralisation de 4 ml de filtrat.

1. 6. — *Chromatographie sur gel*

6 ml de filtrat après précipitation à $\text{pH } 4,60$ (selon 1. 5. 2. 1.) étaient chromatographiés sur une colonne $1\ 280 \times 20\text{ mm}$ de Bio-gel P2 $100-200\text{ mesh}$ (Bio-Rad Laboratories) équilibrée en acide acétique M . L'élution était réalisée par l'acide acétique M avec une vitesse d'écoulement de 35 ml/h . Les fractions recueillies étaient de $5,3\text{ ml}$. Le repérage des fractions était effectué par enregistrement en continu à 280 nm de la densité optique de l'éluat et par mesure de la densité optique à 570 nm après coloration à la ninhydrine effectuée sur 1 ml des fractions (1 sur 2 selon la technique décrite ci-dessus (1. 5.)).

1. 7. — *Chromatographie bidimensionnelle*

La recherche des acides aminés libres était effectuée sur les différents pics obtenus après chromatographie sur gel, après réduction du volume de ceux-ci à 0,8 ml, par concentration à l'évaporateur rotatif, à 40°C. 50 microlitres de la solution concentrée était disposés sur une feuille de papier Whatman 3 MM. Les chromatographies étaient effectuées à 23°C dans le sens descendant pendant 20 h. On utilisait le mélange butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5 ; *v : v : v*) pour la première chromatographie et le mélange butanol-méthyléthylcétone — ammoniacque 17 N-eau (5 : 3 : 1 : 1 ; *v : v : v : v*) pour la deuxième chromatographie. Après séchage, les acides aminés étaient révélés par trempage des feuilles dans le mélange suivant : ninhydrine 1 g, collidine 50 ml, éthanol 950 ml, puis séchage à 50°C dans une étuve ventilée.

1. 8. — *Chromatoélectrophorèse*

Sur les solutions concentrées décrites ci-dessus (1. 7.), les peptides et les acides aminés étaient aussi recherchés par chromatoélectrophorèse. 50 microlitres de solution étaient disposés sur une feuille de papier Whatman 3 MM. On effectuait d'abord une électrophorèse à haute tension (appareil Pherographe, L. Hormuth, Heidelberg) en tampon de pH 4,70 (pyridine-acide acétique-eau, 2 : 2 : 96 ; *v : v : v*) ; ce tampon était dilué 10 fois pour humecter les feuilles avant électrophorèse. La tension de 56 volts/cm était appliquée pendant 45 mn. Après séchage, on effectuait dans le sens perpendiculaire à celui de la migration électrophorétique, une chromatographie descendante, à 23°C, pendant 8 h dans le mélange butanol-acide acétique décrit ci-dessus (1. 7.). La révélation des peptides et des acides aminés était effectuée dans le mélange ninhydrine-collidine ci-dessus (1. 7.).

2. — **RÉSULTATS**2. I. — *Mise au point des conditions expérimentales*

Aucune activité protéolytique exocellulaire n'ayant pu être mise en évidence dans le milieu de culture quelque soit le stade de la culture, seule l'activité protéolytique liée aux cellules a donc été considérée. Au cours d'essais préliminaires quelques facteurs ayant une incidence au niveau de la préparation des extraits cellulaires et du dosage des activités protéolytiques ont été étudiés.

2. II. *Traitement aux ultrasons.*

Comme il est montré au tableau 1 la majeure partie de l'activité protéolytique contenue dans la fraction soluble est libérée après 10 mn de traitement aux ultrasons. On note encore une légère augmentation de l'activité après 20 mn alors qu'un traitement de 30 mn entraîne au contraire une diminution très nette.

2. 12. *Répartition de l'activité protéolytique suivant les fractions cellulaires.*

Comme le montre les résultats du tableau 2, l'activité protéolytique de la suspension de cellules est beaucoup plus élevée lorsqu'elles ont subi un traitement aux ultrasons. Cependant, l'activité protéolytique de la fraction soluble ne représente qu'une faible partie (26,5 p. 100) de l'activité totale des cellules traitées aux ultrasons. Dans le but d'extraire toutes les activités protéolytiques liées aux cellules, nous avons fait agir le lysozyme sur les cellules ayant déjà subi un traitement de 20 mn par les ultrasons, soit directement soit après séparation de la fraction soluble et remise en suspension en tampon. Non seulement le traitement au lysozyme ne libère pas de

TABLEAU I

Activité de la fraction soluble après désintégration des cellules aux ultrasons

Durée du traitement aux ultrasons (mn)	Activité protéolytique (DO à 570 nm *) de la fraction soluble diluée au	
	1/50	1/100
10	0,345	0,090
20	0,370	0,115
30	0,305	0,060

Mélange réactionnel à pH 6,0 incubé 4 h à 37°C.

* Dosage sur 1 ml de filtrat TCA 12 p. 100 par le réactif à la ninhydrine.

TABLEAU 2

Influence du traitement subi par les cellules sur leur activité protéolytique

Suspension cellulaire ou fraction soluble diluée au 1/10.

Mélange réactionnel à pH 6,0 incubé 6 h à 37°C

Dosage sur 1 ml de filtrat TCA 12 p. 100 par 1 ml de réactif à la ninhydrine
fraction soluble = surnageant après centrifugation des cellules traitées

Traitement et nature de l'extrait enzymatique	Activité protéolytique (DO à 570 nm) Mélange réactionnel	
	Témoin	+ FeSO ₄ 5 · 10 ⁻⁴ M L-cystéine 5 · 10 ⁻⁵ M
Cellules entières	0,145	
Cellules désintégrées aux ultrasons	0,680	0,650
Fraction soluble	0,180	0,130
Cellules désintégrées aux ultrasons + lysozyme (2 h à 37°C) fraction soluble	0,030	0,055
Cellules désintégrées aux ultrasons + lysozyme (2 h à 37°C) + ClNa, 2 M Fraction soluble	0,050	0,020
Cellules désintégrées aux ultrasons + incubation (2 h à 37°C)	0,070	

nouvelles activités protéolytiques mais entraîne au contraire une diminution très forte de l'activité protéolytique (tabl. 2). Ce phénomène n'est pas dû au lysozyme mais paraît résulter plutôt de l'incubation à 37°C pendant 2 h. La présence de sulfate de fer et de L-cystéine qui permet chez la souche de *S. lactis* étudiée par COWMAN et SPECK (1967) de stimuler l'activité protéolytique de la fraction soluble et surtout de la fraction particulaire n'a pas d'effet et provoque même une légère inhibition.

Le but du travail étant l'étude de l'action globale du système protéolytique de *S. lactis* sur la caséine, dans tout ce qui suit nous avons utilisé comme extrait enzymatique la suspension de cellules ayant subi un traitement aux ultrasons.

2. 13. Influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse de la caséine entière.

Comme il est montré figure 1 la température optimale d'hydrolyse de la caséine entière par le broyat total après traitement aux ultrasons, se situe vers 30°C environ.

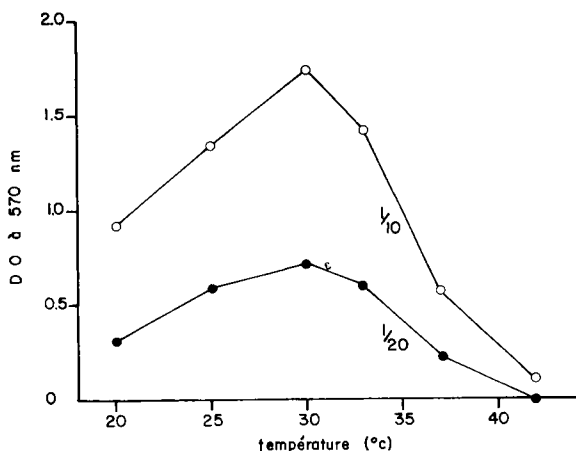


FIG. 1. — Influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse de la caséine entière par le broyat cellulaire total

Broyat dilué au 1/10^e ou au 1/20^e.
Mélange réactionnel à pH 6,0 incubé pendant 6 heures.
Réaction à la ninhydrine sur filtrat TCA 12 p. 100.

Cette valeur assez basse peut être expliquée par l'instabilité du système protéolytique à des températures supérieures (tabl. 2).

2. 14. Influence du pH sur la vitesse d'hydrolyse de la caséine entière.

Comme il est montré figure 2, le pH optimal d'hydrolyse de la caséine entière par le broyat cellulaire total se situe à pH 7,0 environ. A pH 8,20 on ne détectait plus aucune hydrolyse de la caséine. L'activité protéolytique mesurée à pH 5,65 représentait encore 45,6 p. 100 de l'activité mesurée à pH 7,0.

2. 15. Influence de la durée d'incubation.

Comme le montre la figure 3, l'hydrolyse à 30°C de la caséine entière, à pH 7,0, par le broyat cellulaire total, se prolonge jusqu'à 100 h environ. Cependant, un très net ralentissement de l'hydrolyse est observé après 75 h (en particulier dans le cas du dosage par coloration à la ninhydrine).

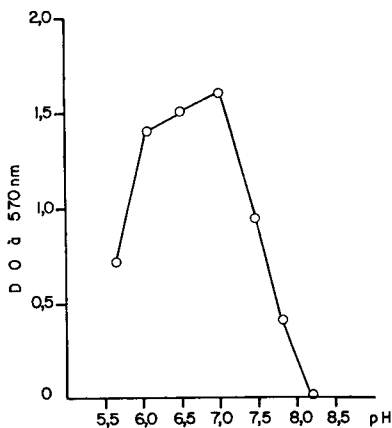


FIG. 2. — Influence du pH sur la vitesse d'hydrolyse de la caséine entière par le broyat cellulaire total

Broyat dilué 10 fois.
Mélange réactionnel incubé 6 heures à 30°C.
Réaction à la ninhydrine sur filtrat TCA 12 p. 100.

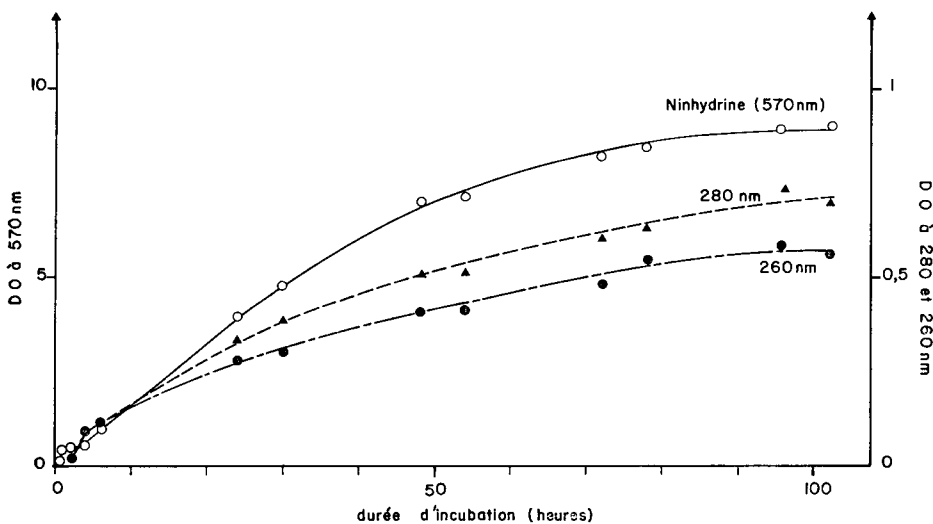


FIG. 3. — Influence de la durée d'incubation du mélange réactionnel sur la vitesse d'hydrolyse de la caséine

Broyat cellulaire dilué 10 fois.
Mélange réactionnel à pH 6,0 agité au cours de l'incubation à 30°C.
Densités optiques du filtrat après précipitation par le TCA 12 p. 100 (260-280 nm), éventuellement dilution et coloration à la ninhydrine (570 nm).

2. 16. *Influence du merthiolate.*

L'addition de merthiolate nécessaire pour éviter le développement de contaminations dans le mélange réactionnel au cours des incubations prolongées n'a pas d'effet sur l'activité protéolytique mesurée après 6 h d'incubation à 30°C.

2. 2. — *Hydrolyse de la caséine entière*2. 21. *Différentes formes d'azote solubilisé.*

Après 50 h d'hydrolyse de la caséine entière par le broyat cellulaire total, les substances azotées solubles à pH 4,60 (NST) dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 et à 12 p. 100 (NPN) et dans l'acide phosphotungstique (NS, APT) ont été dosées par les quatre méthodes comme il est indiqué dans le tableau 3. Il est tout à fait

TABLEAU 3

Dosage des différentes formes d'azote solubilisé après une hydrolyse de 50 h de la caséine entière par le broyat cellulaire total

Broyat cellulaire dilué au 1/10. Mélange réactionnel à pH 6,0 incubé à 30°C pendant 50 h. Les densités optiques et les teneurs en azote indiquées dans le tableau représentant la différence entre les mesures effectuées après 50 h d'incubation et celles effectuées au temps 0

Fractions solubles	Densité optique à			Teneur en azote	
	260 nm	280 nm	570 nm après coloration à la ninhydrine	µg par ml	p. 100 de l'azote total
A pH 4,60 (NST) ..	0,410	0,530	4,760	158	11,8
Dans le TCA 2 p. 100.	0,496	0,554	5,600	177	13,2
Dans le TCA 12 p. 100 (NPN)	0,268	0,536	6,100	162	12,0
Dans l'acide phos- photungstique (NS APT)	—	—	4,33	104	7,78

remarquable de noter la similitude des valeurs obtenues pour les filtrats à pH 4,60 et les filtrats trichloracétiques à 2 p. 100 et à 12 p. 100. Ceci laisse supposer que le système protéolytique de *S. lactis* ne libérerait en majeure partie que des peptides de très faible poids moléculaire et des acides aminés libres. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par le fait que l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique représente 65,8 p. 100 de l'azote soluble à pH 4,60 ; le reste étant constitué de peptides puisque la teneur en azote soluble dans le TCA à 12 p. 100 est la même qu'à pH 4,60 et l'acide phosphotungstique ne précipite pas les très courts peptides ni les acides aminés monoaminés (MOGENSEN, 1948). En outre, la teneur en groupement aminé (ninhydrine) de cette fraction est très peu inférieure à celle de la fraction soluble à pH 4,60 ce qui montre également que l'azote soluble est essentiellement constitué d'acides aminés et de très courts peptides.

TABLEAU 4

Répartition de l'azote solubilisé après hydrolyse de la caséine entière, et chromatographie sur Bio-gel P2

Fraction (1)	I	II	III	IV	V	VI
Absorbance moyenne après coloration à la ninhydrine	0,097	0,214	0,886	0,225	0,196	0,086
Azote (en mg)	211,3	266,6	263,9	89,4	85,8	85,8
Azote (en p. 100 de l'azote soluble à pH 4,6, NST)	16,9	21,3	21,1	7,1	6,8	6,8
Action du TCA 12 p. 100 (2) .	+	—	—	—	—	—
Action de l'acide phosphotungstique (2)	++	+	+	±	—	—

(1) Comme il est indiqué sur la figure 4.

(2) + précipitable ;
— non précipitable.

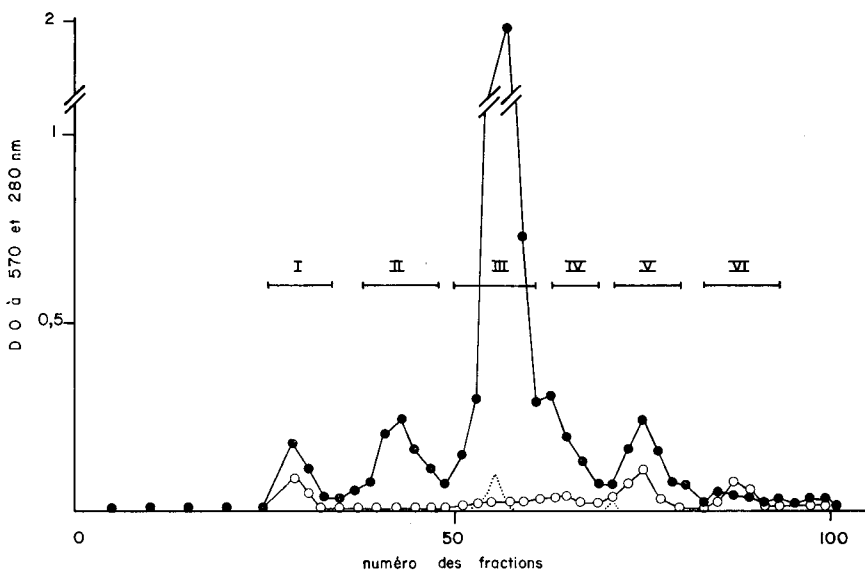


FIG. 4. — Chromatographie sur Bio-gel P2 de l'hydrolysate de caséine entière par le broyat cellulaire total

Colonne 1 280 × 20 mm. Volume des fractions 5,3 ml. Débit 35 ml/h. Élué par CH₃COOH M de 6 ml de mélange réactionnel après 50 heures (ou 0 heure d'hydrolyse) (d'après le tableau 4) après précipitation à pH 4,60.

Densité optique à 570 nm : réaction à la ninhydrine sur 1 ml des fractions. ●—● : après 50 heures d'hydrolyse ; ○—○ : 0 heure. Densité optique à 280 nm ○—○ après 50 heures d'hydrolyse.

Il faut noter que les densités optiques après coloration à la ninhydrine obtenues pour les filtrats trichloracétiques à 2 p. 100 et surtout à 12 p. 100 sont supérieures à celles obtenues pour le filtrat à pH 4,60.

2. 22. Fractionnement de l'hydrolysate de caséine entière par chromatographie sur gel.

Les peptides et les acides aminés contenus dans le filtrat à pH 4,60 de l'hydrolysate de caséine entière par le broyat cellulaire total, après 50 h d'incubation, ont été fractionnés en six fractions principales sur une colonne de Bio-gel P 2, après dosage de l'éluat à 280 nm et à 570 nm après coloration à la ninhydrine (fig. 4). Le pic I qui apparaît au niveau du volume mort de la colonne correspond à des peptides de poids moléculaire égal ou supérieur à 1 800 environ ; ceux-ci contiennent vraisemblablement des acides aminés à noyaux aromatiques puisqu'une absorption à 280 nm peut être mesurée. Le pic II correspond à la zone d'éluion des substances de poids moléculaire compris entre 300 et 600 et des acides aminés diaminés qui ont tendance à être anormalement élués du gel dans les conditions utilisées pour ce travail. Le pic III correspond à la zone d'éluion d'acides aminés libres ; quant aux pics IV, V et VI, dont le volume d'éluion est supérieur au volume total de la colonne, ils contiennent des

TABLEAU 5

Libération des acides aminés libres après hydrolyse de la caséine entière par le broyat cellulaire total

Fraction (1)	I	II	III	IV	V	VI
Lysine		+				
Arginine		+				
Acide aspartique et asparagine.			+	±		
Acide glutamique et glutamine.				+		
Sérine			+++	±		
Thréonine			+			
Glycine			+++			
Valine			+++			
Méthionine			+	++	±	
Leucine			+++			
Isoleucine			+++			
Proline			+++			
Phénylalanine				++		
Tyrosine					+	
Présence de peptides	++	++	+	±	+	+
et nombre de taches (2)	1	2	1	1	2	1

+++ : coloration très intense ;

++ : coloration intense ;

+ : coloration moyenne ;

± : coloration faible.

(1) Comme il est indiqué sur la figure 4.

(2) Nombre de taches ne correspondant pas à des acides aminés et présentes sur les chromatogrammes ou chromatoclectrophorégrammes.

courts peptides riches en acides aminés aromatiques ou ceux-ci à l'état libre puisqu'une absorption à 280 nm peut être mesurée. Comme il est montré au tableau 4 la présence de peptides de haut poids moléculaire dans le pic I est confirmée par le fait que certains de ceux-ci sont précipitables par l'acide trichloracétique à 12 p. 100. La présence de peptides de bas poids moléculaire ou d'acides aminés diamminés est confirmée pour les pics II et III du fait qu'ils renferment des substances précipitables par l'acide phosphotungstique. Enfin, la comparaison entre les valeurs obtenues après dosage des groupes NH_2 -libres par la méthode à la ninhydrine et celles obtenues par dosage de l'azote-Kjeldahl, confirme bien la présence de nombreux acides aminés libres dans le pic III puisque, pour des valeurs d'azote total voisines, les valeurs obtenues après coloration à la ninhydrine sont respectivement 9,1 et 4,1 fois plus fortes pour le pic III que pour les pics I et II (tabl. 4).

2. 23. Détection des peptides et des acides aminés libres.

Le tableau 5 récapitule les résultats que nous avons obtenus par les chromatographies électrophorèses et les chromatographies bidimensionnelles. Ils confirment la présence de plusieurs peptides dans les pics I et II et d'acides aminés diamminés (lysine et arginine) dans le pic II. De même, dans le pic III ils mettent en évidence de fortes concentrations de sérine, glycine, valine, leucine, isoleucine et proline, et de faibles concentrations en acide aspartique, thréonine et méthionine. Dans le pic IV seules la phénylalanine et la valine (ou la méthionine) sont détectées en quantités notables ; il en est de même pour la tyrosine dans le pic V. Les pics III et VI contiennent également des peptides mais en quantité faible, nettement plus basse que dans les pics I et II.

DISCUSSION

Le but de ce travail étant avant tout d'étudier l'action globale du système protéolytique de *S. lactis* sur la caséine entière, seules quelques propriétés de ce système ont été examinées pour effectuer l'hydrolyse dans les conditions optimales. Néanmoins certaines remarques peuvent être faites sur les propriétés qui ont été examinées.

Par exemple le fait qu'une part importante de l'activité protéolytique de *S. lactis* 261 soit liée aux débris cellulaires, vraisemblablement aux membranes, et non présente dans la fraction cytoplasmique soluble, est comparable à ce qui a été observé précédemment par WESTHOFF, COWMAN et SPECK (1971), et COWMAN et SPECK (1967) chez une autre souche et l'un de ses mutants. Cependant, chez la souche *S. lactis* CNRZ 261, les enzymes protéolytiques liées aux débris cellulaires ne paraissent pas extractibles par un traitement au lysozyme et au chlorure de sodium, vraisemblablement en raison de leur instabilité. En outre ni le système protéolytique soluble, ni surtout le système particulier ne sont activés par la cystéine et par les ions Fe^{++} ce qui constitue également une particularité. En effet, les réducteurs surtout, stimulent l'activité protéolytique non seulement de la souche étudiée par COWMAN et SPECK (1967) mais aussi d'autres souches de *S. lactis* (BARIBO et FOSTER, 1952 ; VAN DER ZANT *et al.*, 1953). De même la température optimale d'hydrolyse de la caséine par

S. lactis CNRZ 26I est très inférieure à celle des systèmes protéolytiques solubles d'autres souches de *S. lactis* (DUCASTELLE *et al.*, 1969 ; BARIBO *et al.*, 1952 ; VAN DER ZANT *et al.*, 1953 ; SATO et NAKASHIMA, 1965) pour lesquelles elle atteint ou dépasse 40°C, température au-dessus de laquelle nous n'observons pratiquement plus d'activité. Le système protéolytique de *S. lactis* 26I est donc remarquable par son instabilité tout au moins sous la forme d'extrait brut contenant les débris cellulaires. Pour différentes propriétés, il serait intéressant d'entreprendre une étude plus approfondie des constituants du système protéolytique de cette souche.

Par contre le pH optimum de l'hydrolyse de la caséine, voisin de la neutralité que nous avons observé est comparable à celui rapporté dans les études précédentes, concernant des extraits bruts et qui se situait généralement entre pH 6,0 et 7,0 (DUCASTELLE *et al.*, 1969 ; VAN DER ZANT *et al.*, 1953 ; WESTHOFF *et al.*, 1971 a ; BARIBO *et al.*, 1952 ; SATO *et al.*, 1965 ; BUDLAWSKI *et al.*, 1969).

Lorsqu'on considère l'action du système protéolytique de *S. lactis* CNRZ 26I sur la caséine totale, le premier fait qui attire l'attention c'est qu'elle est faible puisque même en 50 h, moins de 12 p. 100 de l'azote protéique total est solubilisé. Ceci est bien inférieur à ce qu'on observe avec certaines enzymes comme la protéase neutre de *Micrococcus caseolyticus* qui solubilise près de 70 p. 100 de la caséine (DESMAZEAUD et HERMIER, 1972) mais est comparable à ce qui a été obtenu avec d'autres souches de *S. lactis* (BUDLAWSKI *et al.*, 1969).

Du fait de la méthodologie employée, faisant appel à un réactif précipitant le mélange réactionnel en fin d'hydrolyse, la formation éventuelle de gros fragments peptidiques, vraisemblablement insolubles à pH 4,6, n'a pu être étudiée. D'autre part, certaines incertitudes subsistent au niveau de la détermination de la nature des acides aminés libérés, puisque nous n'avons pu faire appel qu'à des méthodes qualitatives. En effet, il est toujours difficile de différencier avec certitude un acide aminé, d'un court peptide en ne se basant que sur le critère des migrations relatives. De même la glutamine et l'asparagine n'ont pas été distinguées, respectivement, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique, du fait de la complexité des solutions étudiées.

Pendant, dans ces conditions expérimentales, ce que caractérise le système protéolytique du streptocoque lactique étudié, c'est qu'il libère essentiellement des acides aminés et des peptides de très bas poids moléculaire constitués vraisemblablement de moins de cinq résidus d'acides aminés. Seulement 16 p. 100 de l'azote soluble libéré est constitué de peptides d'un poids moléculaire supérieur à 1 800 daltons. D'autre part, dans les acides aminés libérés par *S. lactis* CNRZ 26I, seulement une partie des constituants des caséines est présente ; on constate par exemple que les plus importants (acide glutamique, glutamine) n'apparaissent qu'en quantité faible et que certains (cystéine, histidine, tryptophane ou alanine) n'apparaissent pas ou sont seulement présents à l'état de trace. En outre il ne semble pas qu'il y ait une grande diversité dans les peptides libérés. L'ensemble de ces résultats tend à montrer que le système protéolytique de *S. lactis* est constitué d'une part de peptidases libérant des acides aminés libres, d'autre part de protéases de spécificité relativement étroite, libérant des peptides servant éventuellement de substrats à ces peptidases.

Les résultats obtenus avec les extraits de *S. lactis* CNRZ 26I aussi bien en ce qui concerne la faible activité protéolytique que le type de produits libérés confirment les résultats obtenus en culture sur lait pour cette souche (KIKUCHI, DESMAZEAUD et BERGÈRE, 1973)

Comparés aux résultats d'analyse de certains fromages (Do Ngoc, LENOIR et CHOISY, 1971 ; RYMASZEWSKI, POZNANSKI et MAGINSKA, 1971 ; TOKITA et NAKANISHI, 1963 ; REITER *et al.*, 1969 ; BUDLAWSKI, DAMICZ et POGORZELSKI, 1969 ; OHMYA et SATO, 1970) dont seulement 10 p. 100-15 p. 100 de la caséine sont hydrolysés et où les streptocoques lactiques constituent la flore principale, ils montrent que ces bactéries jouent certainement un rôle dans la maturation et soulignent l'importance de leurs systèmes protéolytiques particuliers.

Reçu pour publication en septembre 1973.

SUMMARY

FITNESS OF LACTIC STREPTOCOCCI FOR PROTEOLYSIS II. — STUDY OF ACTION OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* PROTEOLYTIC SYSTEM ON WHOLE CASEIN

The action of the proteolytic system of a *S. lactis* strain on whole casein was generally characterized with supersonically treated cells.

Optimal temperature is 30°C and optimum pH about 7.0. In these conditions, after 50 hours of incubation, only 12 p. 100 of the casein becomes soluble at 4.6 pH and the soluble products thus released are mostly components of low molecular weight. In fact, soluble nitrogen in phosphotungstic acid represents 65.8 p. 100 of soluble nitrogen at 4.6 pH.

When these hydrolysis products are fractionated by gel filtration, they are seen to be essentially constituted of peptides of a molecular mass of less than 1800 daltons, and especially of amino acids. Analysis of the latter by paper chromatography and electrophoresis reveals strong concentrations of serine, glycine, valine, leucine, isoleucine and proline and lesser amounts of aspartic acid, threonine, methionine, phenylalanine and tyrosine.

These results tend to show that the *S. lactis* proteolytic system is composed of peptidases and proteases of narrow specificity having a limited action on casein.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARIBO L. E., FOSTER E. M., 1952. The intracellular proteinase of certain organisms from cheese and their relationship to the proteinase in cheese. *J. Dairy Sci.*, **35**, 149-160.
- BERGÈRE J.-L., 1968. Production massive de cellules de streptocoques lactiques. I. Méthodes générales d'étude et facteurs de la croissance de *Streptococcus lactis* souche C 10. *Le Lait*, **48**, 1-11.
- BERGÈRE J.-L., HERMIER J., 1968. La production massive de cellules de streptocoques lactiques. II. Croissance de *Streptococcus lactis* dans un milieu à pH constant. *Le Lait*, **48**, 13-30.
- BUDLAWSKI J., BONDAR J., DAWICZ W., MARKIEWICZ K., 1969. Studies on proteolytic activity of extracellular enzymes from certain lactic streptococci. *Zesz. nauk WSR Olszt.*, **25**, 243-255.
- BUDLAWSKI J., DAWICZ W., POGORZELSKI K., 1969. Characterization of nitrogen compounds in Tilsit cheese, with special consideration of peptides. *Zesz. nauk WSR Olszt.*, **25**, 267-285.
- COWMAN R. A., SPECK M. L., 1967. Proteinase enzyme system of lactic streptococci. I. Isolation and partial characterization. *Appl. Microbiol.*, **15**, 851-856.
- COWMAN R. A., YOSHIMURA S., SWAISGOOD H. E., 1968. Proteinase enzyme system of lactic streptococci. III. Substrate specificity of *Streptococcus lactis* intracellular proteinase. *J. Bacteriol.*, **95**, 181-187.
- DESMAZEAUD M. J., HERMIER J. H., 1972. Isolement et détermination de la composition qualitative de peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 190-198.
- DoNgoc M., LENOIR J., CHOISY C., 1971. Les acides aminés libres des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Rev. Lait Franç.*, **288**, 447-462.

- DUCASTELLE A., LENOIR J., 1969. Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. *Le Lait*, **49**, 615-636.
- KIKUCHI T., DESMAZEAUD M. J., BERGÈRE J.-L., 1973. Aptitude des streptocoques lactiques à la protéolyse. I. Étude de l'action de streptocoques lactiques mésophiles sur les constituants azotés du lait. *Le Lait*, **53**, 369-385.
- KLIMOVSKI I. I., ZVYAGINTSEV V. I., GUDKOV A. V., 1969. Comparative studies of products of proteolysis by different types of lactic streptococci. *Moloch. Prom.*, **30**, 26-32.
- KUNITZ M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291-310.
- MOGENSEN M. T. S., 1948. Determination of the degree of proteolytic decomposition in cheese, with special reference to the formol titration. *Meddelande Frau Statens Mejeriförsök*, **21**, 281-436.
- 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.
- OHMIYA K., SATO Y., 1970. Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. XI. The ripening of aseptic rennet curd by *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus helveticus*. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1463-1469.
- PREGL F., 1939. In *La pratique de la microanalyse organique quantitative*, p. 140-153, Dunod Éd., Paris.
- REITER B., SOROKIN Y., PICKERING A., HALL A. J., 1969. Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.*, **36**, 65-76.
- RYMASZEWSKI J., POZNANSKI S., 1968. The breakdown of kappa-casein components by cell suspension of lactic acid bacteria. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **16**, 609-614.
- SASAKI R., NAKAE T., 1959. Studies on the distribution and properties of lactic acid bacteria in cow's milk in Japan. III. Characteristics of proteolytic enzymes produced by some lactic acid bacteria. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **30**, 7-10.
- SATO Y., NAKASHIMA T., 1965. Studies on the proteolytic action of lactic acid bacteria. I. Sonicated preparation and their action to casein. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **39**, 299-306.
- SATO Y., OHMIYA K., 1966. Study on protease of dairy bacteria. II. Action of intracellular protease of lactic acid bacteria on paracasein. *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 731-741.
- SMITTLE R. B., KOBURGER J. A., 1968. Storage of lactic streptococci. II. Proteinase synthesis following storage in phosphate buffer. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1752-1755.
- TOKITA F., NAKANISHI T., 1963. On constituent and N-terminal amino acid patterns of lower molecular weight peptides in ripe Edam cheese. *Milchwissenschaft*, **18**, 606-609.
- VAN DER ZANT W. C., NELSON F. E., 1953. Characteristics of an endocellular proteolytic enzyme system of *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, **36**, 1212-1222.
- WESTHOFF D. C., COWMAN R. A., SPECK M. L., 1971 a. Isolation and partial characterization of a particulate proteinase from a slow acid producing mutant of *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1253-1258.
- WESTHOFF D. C., COWMAN R. A., 1971 b. Substrate specificity of the intracellular proteinase from a slow acid producing mutant of *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1265-1269.
- WESTHOFF D. C., COWMAN R. A., 1971 c. Influence of the growth medium on the proteinase system of *Streptococcus lactis* n° 3. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1286-1287.
- WILLIAMSON W. T., TOVE S. D., SPECK M. L., 1964. Extracellular proteinase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **87**, 49-53.