



HAL
open science

Aspect qualitatif de l'activité protéolytique des lactobacilles thermophiles utilisés en fabrication de fromages à pâte pressée cuite

Marie-Amélie Chopard, Marc Schmitt, Eric Perreard, Jean-François Chamba

► To cite this version:

Marie-Amélie Chopard, Marc Schmitt, Eric Perreard, Jean-François Chamba. Aspect qualitatif de l'activité protéolytique des lactobacilles thermophiles utilisés en fabrication de fromages à pâte pressée cuite. *Le Lait*, 2001, 81 (1-2), pp.183-194. 10.1051/lait:2001122 . hal-00895471

HAL Id: hal-00895471

<https://hal.science/hal-00895471>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Physiologie, métabolisme

Aspect qualitatif de l'activité protéolytique des lactobacilles thermophiles utilisés en fabrication de fromages à pâte pressée cuite

Marie-Amélie CHOPARD^{a*}, Marc SCHMITT^b, Eric PERREARD^a,
Jean-François CHAMBA^a

^a ITFF, 419 route des champs laitiers, BP 30, 74801 La Roche-sur-Foron Cedex, France

^b LARF-ITFF, rue de la laiterie, BP 19, 25620 Mamirolle, France

Abstract — Qualitative aspect of proteolytic activity of thermophilic lactobacilli using in Swiss cheeses. The average peptidic pattern was established from 253 French Emmental cheeses sampled in 50 factories. It contained 53 peptidic peaks, 4 of which were the most important in quantity. Two *Lactobacillus helveticus* strains and five *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* strains were tested in Emmental experimental cheesemaking in association with three different propionic strains (21 cheeses). The *Propionibacterium freudenreichii* strains did not affect the peptidic pattern of ripened Emmental cheese. On the other hand, 13 peptidic peaks were significantly influenced by the thermophilic lactobacilli strain. The two species of thermophilic lactobacilli were discriminated by three peptidic peaks. Seven peptidic peaks were correlated with the ammonia amount in ripened Emmental cheese. No significant correlation was found between peptidic peaks and SN/TN and NPN/TN. At the same time, the peptidic pattern produced by the seven lactobacilli strains were studied in laboratory. The most specific peptidic peak of the French Emmental cheese were not found by using the Hammarsten casein as substrate. Another substrate, similar to hard cooked cheeses, lyophilized and sterilized by ionisation was tested. This substrate was obtained with microfiltered milk and *Streptococcus thermophilus* strains only. This substrate digested by thermophilic lactobacilli allowed to find the specific peptidic peaks of the French Emmental cheese. For example, the 14th peak obtained in laboratory was significantly different according to lactobacilli species, as it was observed in the Emmental cheese experiments. This peak distinguished the strains inside the *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* too.

peptidic pattern / proteolysis / thermophilic lactobacilli / Emmental

Résumé — Le profil peptidique moyen de l'Emmental français est établi à partir de 253 profils recueillis dans 50 fromageries. Il comprend 53 pics dont 4 majeurs d'un point de vue quantitatif. Deux souches de *Lactobacillus helveticus* et 5 souches de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ont été

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 4 50 03 33 03 ; fax : (33) 4 50 25 82 26 ; bactofrom.laroche@wanadoo.fr

testées en fabrication expérimentale d'emmental avec 3 souches de bactéries propioniques différentes (21 fromages). La souche de *Propionibacterium freudenreichii* n'influence pas le profil peptidique de l'emmental affiné. En revanche, 13 pics du profil peptidique sont significativement influencés par la souche de lactobacilles thermophilesensemencée. Trois pics discriminent l'espèce. Sept pics sont corrélés avec le taux d'ammoniaque des emmentals affinés ; aucune corrélation significative n'est mise en évidence entre les pics des profils peptidiques et NS/NT ou NPN/NT. Le profil peptidique produit par les 7 souches de lactobacilles utilisées en fabrication est également étudié au laboratoire. Les pics majeurs caractérisant l'emmental ne sont pas retrouvés en utilisant la caséine Hammarsten comme substrat. Un substrat fromage lyophilisé et stérilisé par ionisation a été réalisé à partir de mini fromages de fabrication type pâte cuite, élaborés avec du lait microfiltré et ajout de *Streptococcus thermophilus*. Avec un tel substrat hydrolysé par les lactobacilles thermophiles, nous retrouvons les pics majeurs du profil peptidique de l'emmental. Le pic 14 obtenu au laboratoire est significativement différent selon l'espèce *Lb. helveticus* ou *Lb. delbrueckii ssp. lactis*, comme nous l'avons observé en fabrication expérimentale d'emmental. Il discrimine également la souche au sein de l'espèce *Lb. delbrueckii ssp. lactis*.

profil peptidique / protéolyse / lactobacille thermophile / emmental

1. INTRODUCTION

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* et *Lactobacillus helveticus* interviennent précocement dans la fabrication de l'emmental par leur activité acidifiante [5]. Les streptocoques thermophiles ont une faible activité protéolytique [1], ce qui n'est pas le cas des lactobacilles thermophiles [7]. Leur potentiel protéolytique est susceptible de s'exprimer dès le pressage, stade auquel ils atteignent leur concentration maximale [2], jusque dans le fromage affiné ou l'autolyse cellulaire a été montrée [22].

L'étude présentée ici s'inscrit dans une démarche générale de recherche d'une (ou de) méthode(s) pertinente(s) de sélection des souches de lactobacilles thermophiles sur leur activité protéolytique globale (protéinasique, peptidasique, autolytique) tout comme nous l'avons précédemment fait pour l'activité acidifiante [4].

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI) comme moyen de détermination de profils peptidiques de fromages est de plus en plus utilisée [13, 17]. Grappin

et al. [12] ont récemment montré que le profil peptidique de l'emmental est différent de celui des autres fromages à pâte pressée cuite : Comté et Beaufort. Cette technique est utilisée comme moyen d'étude de l'aspect qualitatif de l'activité protéolytique des lactobacilles thermophiles. L'influence de la souche de *Lb. helveticus* ou *Lb. delbrueckii ssp. lactis*ensemencée, lors de la fabrication d'emmental, sur le profil peptidique du fromage affiné est étudiée. Une méthode est mise au point au laboratoire permettant de sélectionner judicieusement les souches, voire de prédire leur comportement en fabrication.

Le profil peptidique moyen de l'emmental français a été défini en premier lieu.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI)

Dix grammes de fromage mouliné sont homogénéisés au Stomacher dans 25 mL d'eau + 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) + 5 % de NaCl [15]. La matière

grasse est éliminée par centrifugation à 2 000 trs·min⁻¹ ; 10 min à 4 °C. Le surnageant est filtré sur filtres Whatman n° 40, puis traité par un mélange chloroforme-méthanol 2/1 (v/v) [16]. Après centrifugation 10 min à 3 000 trs·min⁻¹, le méthanol présent dans la phase aqueuse est évaporé sous vide (40 °C, 2,5 min). L'échantillon est filtré à 0,45 µm. On obtient ainsi la fraction peptidique hydrosoluble.

La chaîne de CLHP-PI est constituée d'une pompe 9010, d'un passeur d'échantillons 9095 et d'un détecteur à barrette de diodes 9065 (Varian, Sunnyvale, USA). La colonne est une Lichrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm ; 5 µm) (Merck, Darmstadt, Allemagne). Avant chaque analyse, le matériel est contrôlé par injection de 4 peptides étalons : β-Interleukine-I (163–171), ACTH (11–24), Bradykinine et pGlu⁶, Pro⁹ Substance P (6-11) (Neosystem Laboratoire, Strasbourg, France). Le dernier peptide est appelé arbitrairement peptide E. Vingt microlitres de ce peptide E sont ajoutés à 300 µL de la fraction peptidique hydrosoluble du fromage. La séparation est obtenue par un gradient linéaire de 45 min (débit de 1 mL·min⁻¹) permettant de passer de 99 % de tampon A (H₂O + TFA 0,1 %) et 1 % de tampon B (acétonitrile (CH₃CN) + TFA 0,1 %) à 25 % de A et 75 % de B. La détection se fait entre 190 nm et 300 nm par l'intermédiaire du détecteur à barrette de diodes. Le profil à 215 nm est essentiellement exploité.

2.2. Mini fabrication de fromages à pâte cuite

Les mini fabrications sont conduites à l'ITFF de Rennes (35) avec du lait épuré par microfiltration [20]. Elles sont réalisées en cuves de 10 L ; 10,3 kg de lait environ sont mis en œuvre pour obtenir un mini fromage de 800 g environ. Le lait estensemencé en lactocoques : MA014, 4 U·1 000 L⁻¹ (Texel, Dangé Saint Romain, France), *Streptococcus thermophilus* : TA060, 7 U·1 000 L⁻¹

(Texel, Dangé Saint-Romain, France) et bactéries propioniques : Cocktail PAL, 0,01 g·L⁻¹ (Standa, Caen, France). Trois souches de lactobacilles thermophiles de la collection du Syndicat Interprofessionnel du Gruyère Français (SIGF) sont testées séparément : 2 souches de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* et 1 souche de *Lb. helveticus*. Une culture mère est effectuée sur laitG (ITFF) reconstitué à 10 % et additionné de 0,5 % d'extrait de levure. La culture est incubée à 44 °C jusqu'à une acidité de 70 °D. Les ferments sont préparés sur milieu Phagex LB (Standa, Caen, France) reconstitué à 13,5 % et chauffé à 90 °C pendant 30 min. Ils sontensemencés avec 10 % de la culture mère et incubés à 42 °C jusqu'à une acidité de 100 °D. Ils sont ensuite refroidis rapidement à une température inférieure à 15 °C et stockés à 4 °C jusqu'au lendemain. Pour chaque lactobacille testé, 3 répétitions sont effectuées, soit 9 fromages fabriqués. Après saumurage, les mini fromages sont paraffinés, puis affinés 21 j à 11 °C et 28 j à 24 °C. En fin d'affinage, le profil peptidique par CLHP-PI est réalisé pour chaque répétition.

2.3. Fabrication expérimentale d'emmental

Les fabrications d'emmental sont conduites à l'ITFF de La Roche-sur-Foron (74) à partir de lait thermisé à 63 °C pendant 20 s. Elles sont réalisées en cuves de 1 000 L ; 900 kg de lait environ sont mis en œuvre pour obtenir un emmental de 75 kg environ. Le lait est mûré 1 h à 32 °C après ensemencement en *Streptococcus thermophilus* : PAL/ITG ST82–87 (Standa, Caen, France), lactobacilles thermophiles et *Propionibacterium freudenreichii*. Sept souches de lactobacilles thermophiles de la collection du SIGF sont testées séparément : 5 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* et 2 *Lactobacillus helveticus*. Chaque lactobacille est associé à 3 souches différentes de bactéries propioniques de la collection du SIGF, soit

21 emmentals fabriqués. Les ferments de lactobacilles sont réalisés de la même façon qu'en minifabrication.

Les fromages sont affinés 15 j à 12 °C, 15 j entre 15 et 16 °C, puis une quarantaine de jours à 22–23 °C et 80–82 % d'humidité relative. Pour chaque emmental affiné sont dosées les fractions azotées : azote total (NT), azote soluble à pH 4,6 (NS), azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 % (NPN) [10], ammoniacque (NH₃). Le profil peptidique de la fraction hydrosoluble du fromage est établi par CLHP-PI.

2.4. Profils peptidiques en conditions de laboratoire

2.4.1. Préparation des suspensions cellulaires

Après avoir vérifié le pouvoir inducteur du lait sur les enzymes protéolytiques (Fig. 1), comme l'ont déjà démontré Ezzat et al. [9] ou Exterkate [8], une méthode de préparation des suspensions cellulaires sur milieu lait a été mise au point.

La souche à tester estensemencée à 2 %, à partir d'une préculture d'une nuit à

37 °C sur laitG (ITFF), dans 300 mL de laitG reconstitué à 10 %, additionné de 0,2 g·L⁻¹ de MgSO₄, 0,05 g·L⁻¹ de MnSO₄ et 5 mL de pourpre de bromocrésol à 1 %, le tout préalablement centrifugé 10 min à 11 000 trs·min⁻¹ à 10 °C. L'incubation est réalisée à 44 °C jusqu'à obtention d'un pH compris entre 5,2 et 5,4, soit au virage de l'indicateur du pourpre au vert. La récupération des cellules se fait après ajout à la culture de 10 mL de citrate trisodique 1 mol·L⁻¹ et 40 mL de solution saline tamponnée (NaCl : 8,5 g, glycérophosphate de sodium : 5 g, Tween 80 : 1 mL, eau distillée : 1 L, pH 7). Après 20 min à température ambiante, la culture est centrifugée 7 min à 4 000 trs·min⁻¹, à 6 °C. Deux lavages successifs sont réalisés dans la solution précédente à 2 500 trs·min⁻¹, 7 min à 6 °C. La concentration cellulaire est standardisée à $5 (\pm 0,2) \times 10^8$ ufc·mL⁻¹ par spectrophotométrie à 650 nm. Les cellules sont perméabilisées par ajout de Triton X 100 à 0,05 %, 20 h minimum à -35 °C.

La perméabilisation permet de simuler les conditions d'autolyse cellulaire des lactobacilles thermophiles dans l'emmental [22]. Ainsi, l'expression enzymatique intracellulaire telle l'activité aminopeptidasique

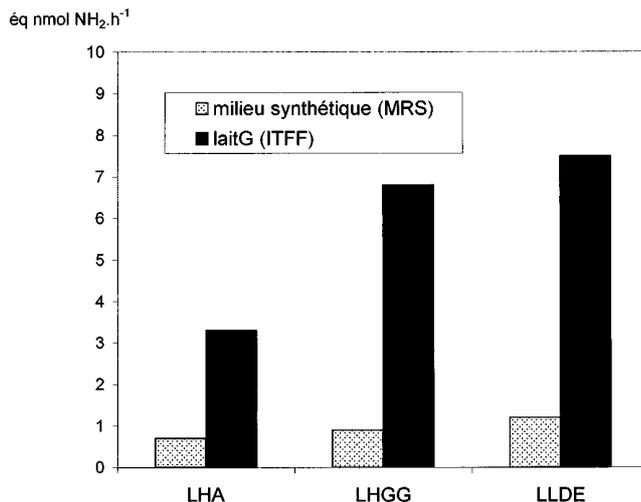


Figure 1. Pouvoir inducteur du lait sur les enzymes protéolytiques. Dosage des groupements aminés libres par l'orthophtaldialdéhyde après précipitation au TCA 2 % ; hydrolyse de la caséine Hammarsten à pH 5,5 et 40 °C.

Figure 1. Inductive capacity of milk on proteolytic enzymes. Titration of free amino group by orthophtaldialdehyde after precipitation by TCA 2 % ; hydrolysis of Hammarsten casein at pH 5.5 and 40 °C.

[19] peut s'exprimer. Seule la perméabilisation cellulaire permet d'obtenir des profils peptidiques aussi riches que ceux des emmentals (nombre et surface des pics).

2.4.2. Substrats d'hydrolyse

Un substrat appelé substrat fromage ST 4 h à été élaboré à partir d'un mini fromage de fabrication type pâte pressée cuite au lait écrémé épuré par microfiltration (ITFF, Rennes). Le lait a étéensemencé à 1,2 ‰ avec une culture de *Streptococcus thermophilus* PAL/ITG (Standar, Caen, France). La fabrication s'est déroulée selon le protocole précédemment décrit [20].

Après 4 h de pressage, le fromage (pH 5,8) est prélevé, puis congelé. Après décongélation, le fromage est découpé, mouliné et lavé (démminéralisation, délactosage), puis mis en suspension dans une solution de citrate trisodique à 2 ‰. Une pâte homogène est obtenue. Elle est alors lyophilisée (Lyophal, Salon de Provence, France), puis aseptisée par ionisation à 20 kGy (Ionisos, Dagneux, France).

La caséine Hammarsten (Merck, Darmstadt, Allemagne), caséine acide obtenue par acidification d'un lait écrémé non pasteurisé [14] est également utilisée. La composition caséique de ces substrats a été déterminée par électrophorèse SDS de la fraction insoluble à pH 4,6 [6]. La caséine Hammarsten ne contient pas de caséines paraK, β dégradée et α s1-I, issues de l'action de la chymosine et de la plasmine (Tab. I).

2.4.3. Mélange de digestion

À 6 mL de solution caséique (16,6 g·L⁻¹ de caséine Hammarsten ou 23,7 g·L⁻¹ de substrat fromage ST 4 h dans du citrate trisodique à 2 ‰ ; azote total à un taux équivalent dans les 2 cas) sont ajoutés 10 mL de tampon citrate trisodique 0,2 mol·L⁻¹/acide acétique 0,2 mol·L⁻¹ (v/v) à pH 5,13 et 4 mL de suspension cellulaire. Le pH final du mélange de digestion est de 5,5. L'hydrolyse dure 96 h, en bain-marie à 20 °C. L'arrêt des réactions enzymatiques se fait par choc thermique 30 min à 80 °C. Un témoin sans suspension cellulaire est réalisé ; il n'évolue pas au cours de l'incubation.

2.5. Traitements statistiques

Les analyses de variance et corrélations sont faites avec l'aide du logiciel statistique STAT-ITCF (version 5).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Profil peptidique moyen de l'emmental français

Le profil peptidique moyen (à 215 nm) de l'emmental français est établi à partir de 253 profils recueillis dans 50 fromageries (32 ‰ de fromages au lait thermisé et 68 ‰ de fromages au lait cru), se répartissant dans 15 départements producteurs d'emmental

Tableau I. Electrophorèse en SDS de la fraction insoluble à pH 4,6 de la caséine Hammarsten et du substrat fromage ST4h (% NT). (–) : absence.

Table I. SDS electrophoresis of pH 4.6 insoluble fraction of Hammarsten casein and substrate cheese ST 4 h (% TN). (–): no present.

| | paraK | β dégradée | γ 2 | γ 3 | γ 1 | K | β | α s2 | α s1 | α s1-I | X |
|-----------------------|-------|------------------|------------|------------|------------|-----|---------|-------------|-------------|---------------|------|
| Caséine Hammarsten | (–) | 1,6 | 1,6 | 1,2 | 4,0 | 5,7 | 33,4 | 35,4 | | (–) | 24,5 |
| Substrat fromage ST4h | 10,7 | 11,0 | 9,5 | 2,0 | 9,3 | (–) | 27,7 | 5,8 | 44,6 | 10,9 | 21,6 |

français (Est et Ouest de la France) et sur une période de 3 années (1997, 1998, 1999). L'échantillonnage choisi est représentatif de la diversité de la production d'emmental français.

Le profil peptidique moyen de l'emmental français est composé de 53 pics. Les pics numérotés 10, 12, 13 et 15 (Fig. 2) sont majeurs d'un point de vue quantitatif (surface du pic) et présents dans tous les profils étudiés. Les pics numérotés 7, 8, 14, 16, 25 et 30 sont présents dans plus de 90 % des profils étudiés. Sur les 53 pics mis en évidence, 5 sont peu fréquents (moins de 10 % des profils étudiés). Trente neuf sont retrouvés dans plus de 60 % des cas. Neuf sont présents dans 30 % à 60 % des profils étudiés.

3.2. Mini fabrication de fromages à pâte cuite

L'effet de la souche de lactobacilles ensemencée sur le profil peptidique des fromages affinés a été déterminé par analyse de variance ($n = 9$). Sur 56 pics analysés, 27 sont significativement différents (surface des pics) au seuil de 1 % selon la souche ensemencée. Vingt pics apparaissent significativement différents selon l'espèce *Lb. helveticus* ou *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*. Quinze pics sont différents selon la souche de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ensemencée.

Les 4 pics : 10, 12, 13 et 15 majoritaires par leur surface dans l'emmental se retrouvent sur les profils peptidiques des mini fromages (comparaison des spectres d'absorption entre

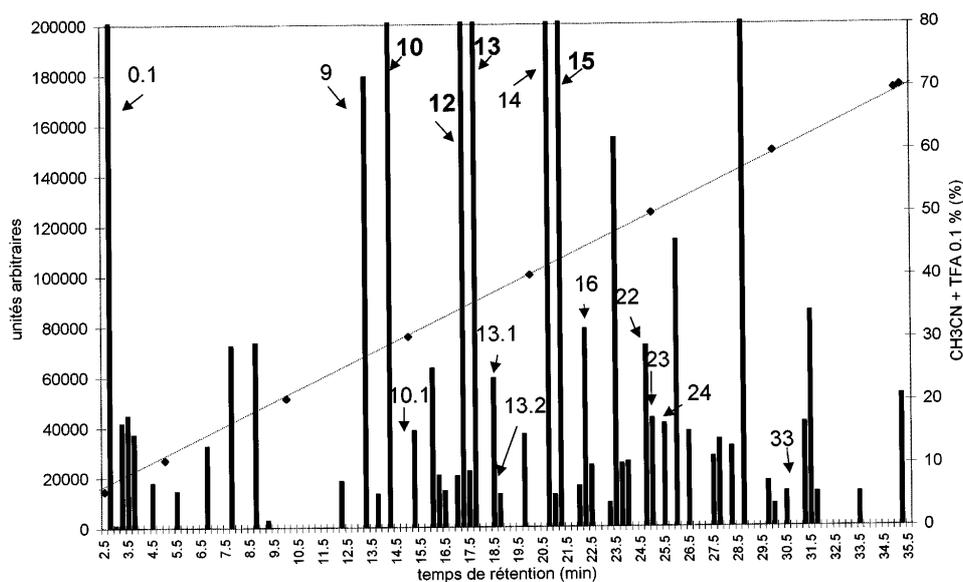


Figure 2. Représentation schématique du profil peptidique moyen de la fraction hydrosoluble de l'Emmental français ($n = 253$). Colonne : Lichrospher 100 RP-18 ; solvant A = H_2O + TFA 0,1 %, solvant B = CH_3CN + TFA 0,1 % ; gradient : 99 % de A + 1 % de B à 25 % de A et 75 % de B en 45 min ; débit : $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; détection : 215 nm.

Figure 2. Schematic representation of average peptidic patterns of water-soluble fraction of French Emmental cheese ($n = 253$). Column: Lichrospher 100 RP-18; solvent A = H_2O + TFA 0.1%, solvent B = CH_3CN + TFA 0.1%; gradient: 99% A + 1% B to 25% A and 75% B in 45 min; rate: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; detection: 215 nm.

190 et 300 nm des profils de l'emmental et des mini fromages). Ces 4 pics ne permettent pas de discriminer les 3 souches de lactobacilles testées.

Ainsi, l'analyse des résultats obtenus en mini fabrication de fromages à pâte cuite, montre que le profil peptidique des fromages affinés est influencé par la souche de lactobacilles thermophilesensemencée.

Il a récemment été montré que le profil CLHP de l'azote soluble du cheddar dépendait fortement de la souche de lactocoque utilisée [18, 21]. Plus exactement, que le type de spécificité des protéinases de paroi déterminait fortement le profil CLHP.

3.3 Fabrication expérimentale d'emmental

Comme précédemment, l'effet de la souche de bactéries propioniques et de lactobacilles thermophilesensemencée sur le profil peptidique de l'emmental a été déterminé par analyse de variance ($n = 21$). Quarante huit pics, sur les 53 potentiellement présents dans l'emmental, sont mis en évidence dans les fromages expérimentaux. Les pics absents dans les fromages expérimentaux sont ceux peu fréquents dans l'emmental français (< 10 %).

Les souches de *Propionibacterium freudenreichii* testées n'influencent pas le profil peptidique des emmentals affinés. De même, les souches étudiées n'influencent pas la protéolyse mesurée par le dosage des fractions azotées et de l'ammoniaque. Ces résultats confortent les travaux de Gagnaire et al. [11] confirmant le faible impact des bactéries propioniques dans la protéolyse secondaire de l'emmental. Onze peptidases ont été caractérisées dont la plupart sont intracellulaires [11]. En l'absence d'autolyse [22], l'activité protéolytique des bactéries propioniques ne semble pas pouvoir s'exprimer.

Parmi les 48 pics, 13 sont significativement différents quantitativement au seuil de

1 % selon la souche de lactobacillesensemencée (Fig. 3). Aucune différence n'apparaît sur l'aire totale des chromatogrammes, ni sur le nombre de pics en fonction de la souche de lactobacillesensemencée. Parmi les 4 pics majeurs : 10, 12, 13 et 15 caractérisant l'emmental français, les pics 12 et 15 discriminent l'espèce de lactobacillesensemencée. Le pic 12 est moindre pour *Lactobacillus helveticus* comparativement à *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*. C'est l'inverse dans le cas du pic 15. Parmi les autres pics, le pic 14 discrimine également l'espèce ; sa surface est plus faible avec *Lactobacillus helveticus* (Fig. 4). Une différence significative est observée selon la souche de lactobacillesensemencée pour les pics 0.1, 9, 10.1, 13.1, 13.2, 16, 22, 23, 24 et 33. Une analyse en composantes principales ne laisse pas apparaître de groupes de souches.

Aucune corrélation significative n'est mise en évidence entre les pics des profils peptidiques et NS/NT ou NPN/NT ($n = 21$). En revanche, 7 pics sont corrélés avec le taux d'ammoniaque des fromages affinés (Tab. II). Les pics 13.2 et 15 sont corrélés positivement au seuil de 1 % au taux d'ammoniaque.

3.4. Profils peptidiques en conditions de laboratoire

Les profils peptidiques sont très différents en fonction du substrat d'hydrolyse. Les pics majeurs caractérisant l'emmental ne sont pas retrouvés en utilisant la caséine Hammarsten (Fig. 5). De plus, sur ce substrat, le peptide étalon E est masqué, alors qu'il a justement été choisi pour apparaître à un temps où aucun pic n'existe dans l'emmental. La caséine Hammarsten ne reflète pas l'état d'hydrolyse dans lequel est la caséine du fromage en début de fabrication lorsque les enzymes bactériennes interviennent. En revanche, les pics 10, 12, 13 et 15, majeurs dans l'emmental affiné, se retrouvent avec le substrat fromage ST 4 h

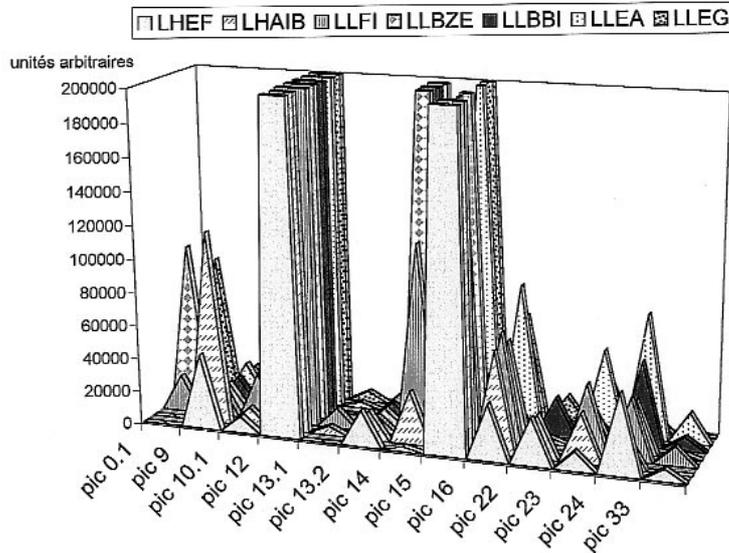


Figure 3. Pics significativement différents au seuil de 1‰ à 1% issus des profils peptidiques des Emmentals expérimentaux fabriqués avec 7 souches différentes de lactobacilles thermophiles (LL : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ; LH : *Lb. helveticus*).

Figure 3. Peaks of peptidic patterns significantly different (1‰ or 1%) in experimental cheeses making with seven different thermophilic lactobacilli strains (LL: *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*; LH: *Lb. helveticus*).

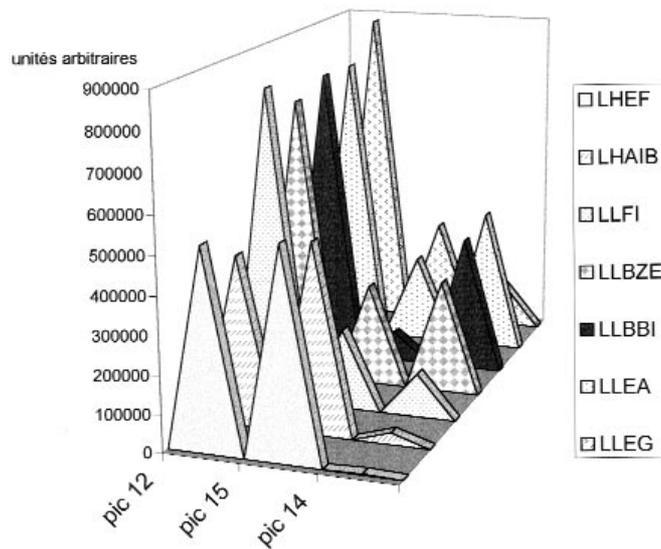


Figure 4. Pics 12, 14 et 15 issus des profils peptidiques des emmentals expérimentaux fabriqués avec 7 souches différentes de lactobacilles thermophiles (LL : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ; LH : *Lb. helveticus*).

Figure 4. Peaks 12, 14 and 15 of peptidic pattern in experimental cheeses making with seven different thermophilic lactobacilli strains (LL: *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*; LH: *Lb. helveticus*).

mis au point (comparaison des spectres d'absorption). La pertinence de l'utilisation d'un substrat plus proche du fromage est donc démontrée (Fig. 6).

Tableau II. Corrélations entre les pics peptidiques et le taux d'ammoniaque obtenus sur les emmentals affinés. α : niveau de signification selon Muller-Newman-Storm.

Table II. Correlations between peptidic peaks and ammonia amount in ripened Emmental cheeses. α : signification level according to Muller-Newman-Storm.

| N° pic | r pour $m = 19$ |
|--------|----------------------------|
| 7 | 0,571 ($\alpha = 1 \%$) |
| 9,1 | 0,653 ($\alpha = 1 \%$) |
| 10 | 0,585 ($\alpha = 1 \%$) |
| 12 | -0,602 ($\alpha = 1 \%$) |
| 13,2 | 0,848 ($\alpha = 1 \%$) |
| 14 | -0,562 ($\alpha = 1 \%$) |
| 15 | 0,845 ($\alpha = 1 \%$) |

L'effet de la souche de lactobacilles thermophiles sur le profil peptidique des hydrolysats a été déterminé par analyse de variance ($n = 14$). Quinze pics apparaissent significativement différents au seuil de 1 % selon la souche testée. Aucune différence n'apparaît sur l'aire totale du chromatogramme, ni sur le nombre de pics du profil peptidique, selon la souche de lactobacilles testée.

Parmi les 4 pics majeurs de l'emmental, les pics 10 et 15 sont significativement différents selon la souche. Les pics 12 et 15 ont précédemment été montrés comme discriminant l'espèce en fabrication expérimentale d'emmental. Le pic 15 discrimine la souche au laboratoire, mais l'effet espèce n'est pas retrouvé. De même, l'effet espèce démontré sur le pic 12 dans les fromages affinés n'est pas retrouvé. Le pic 10 significativement différent au laboratoire ne l'est pas en fabrication expérimentale d'emmental. La formation de ces pics est vraisemblablement

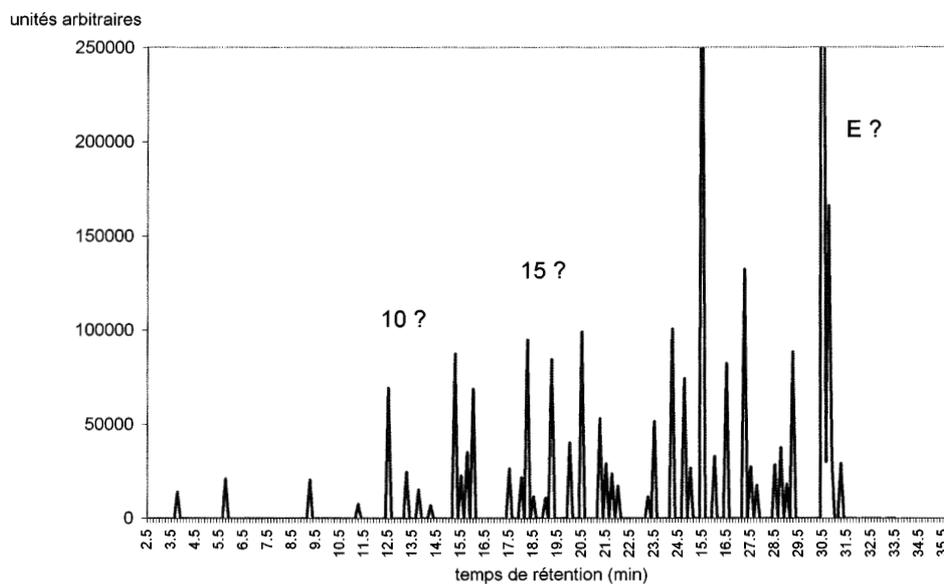


Figure 5. Profil peptidique schématique de la caséine Hammarsten hydrolysée par la souche de *Lb. helveticus* ITG LHEF en cellules perméabilisées à 20 °C pendant 96 h (E = peptide étalon).

Figure 5. Peptidic pattern of Hammarsten casein after hydrolysis by permeabilized cells of *Lb. helveticus* strain ITG LHEF at 20 °C during 96 h (E = standard peptidic).

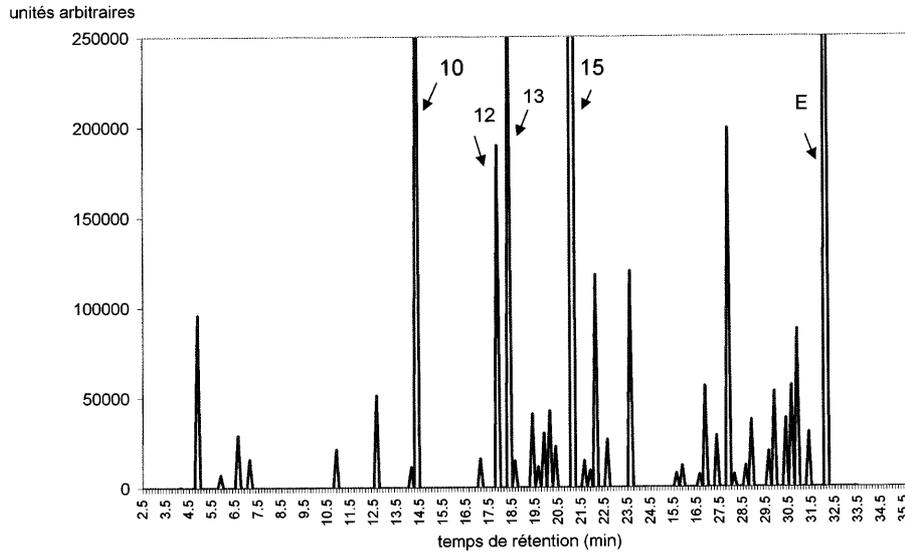


Figure 6. Profil peptidique schématique du substrat fromage ST 4 h hydrolysé par la souche de *Lb. helveticus* ITG LHEF en cellules perméabilisées à 20 °C pendant 96 h (E = peptide étalon).

Figure 6. Peptidic pattern of cheese substrate ST 4 h after hydrolysis by permeabilized cells of *Lb. helveticus* strain ITG LHEF at 20 °C during 96 h (E = standard peptide).

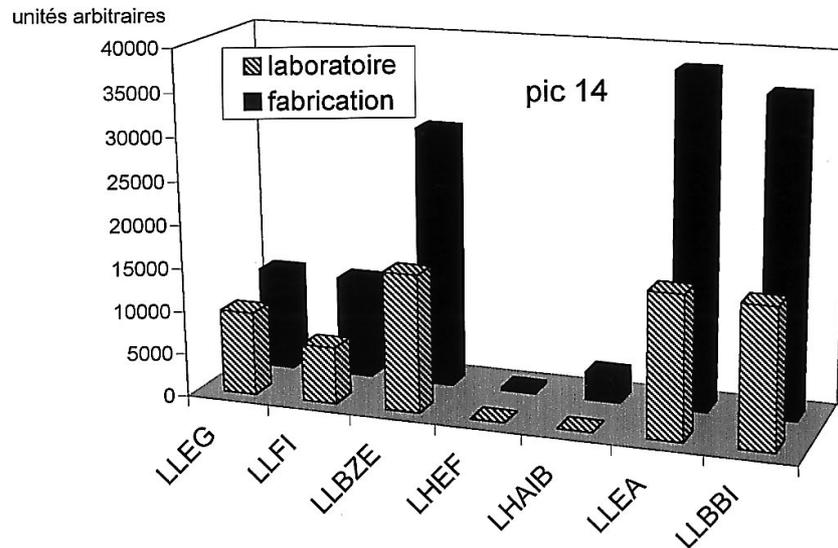


Figure 7. Comparaison du pic 14 issu des profils peptidiques des emmentals expérimentaux et du substrat fromage ST 4 h hydrolysé par 7 souches différentes de lactobacilles thermophiles en cellules perméabilisées à 20 °C pendant 96 h (LL : *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*; LH : *Lb. helveticus*).

Figure 7. Comparison of peak 14 of peptidic pattern in experimental Emmental cheeses and substrate cheese ST 4 h hydrolysed by permeabilized cells of 7 different thermophilic lactobacilli strains at 20 °C during 96 h (LL: *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*; LH: *Lb. helveticus*).

la résultante de systèmes protéolytiques complexes, ce qui explique les différences observées entre le laboratoire et le fromage. Les lactobacilles thermophiles ne sont pas les seuls intervenants dans le processus d'affinage de l'emmental. C'est la résultante de tout un écosystème microbien qui permet d'obtenir le produit fini. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et les pédiocoques jouent un rôle important dans la protéolyse [3]. La population est de l'ordre de 10^8 ufc·g⁻¹ d'emmental affiné. Ils constituent de ce fait ce qu'on appelle la « flore lactique d'affinage ».

Le pic 14 obtenu au laboratoire est significativement différent selon l'espèce *Lactobacillus helveticus* ou *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, comme en fabrication expérimentale d'emmental (Fig. 7). Il est très peu présent avec un ensemencement en *Lb. helveticus*. Il discrimine également la souche au sein de l'espèce *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* : il est significativement moindre pour 2 des 5 souches testées. Ainsi, la résultante de la formation de ce pic peptidique semble être le fait de l'action des enzymes protéolytiques de la souche de lactobacilles thermophiles ensemencée.

4. CONCLUSION

Une méthode de sélection des souches de lactobacilles thermophiles sur l'aspect qualitatif de leur potentiel protéolytique, par détermination du profil peptidique, est disponible et permet d'obtenir des profils similaires à ceux de l'emmental français et discriminant les espèces et les souches. Cette méthode peut être introduite au laboratoire comme moyen de caractérisation des souches de lactobacilles thermophiles destinées à la fabrication d'emmental.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tout particulièrement pour leur collaboration S. Chappaz (LARF-ITFF,

Mamirolle), R. Richoux (ITFF, Rennes), S. Zimmermann, M.A. Poisson et C. Laffin (ITFF, La Roche-sur-Foron), L. Vigouroux (Stage DESS Industries Laitières 1998–1999), ainsi que C. André (ITFF, La Roche-sur-Foron) pour la dactylographie.

RÉFÉRENCES

- [1] Accolas J.P., Hemme D., Desmazeaud M., Vassal L., Bouillanne C., Veaux M., Les levains lactiques thermophiles : propriétés et comportement en technologie laitière. Une revue, Lait 60 (1980) 487–524.
- [2] Accolas J.P., Veaux M., Vassal L., Mocquot G., Évolution de la flore lactique thermophile au cours du pressage des fromages à pâte cuite, Lait 58 (1978) 118–132.
- [3] Chamba J.F., L'Emmental, un écosystème complexe. Conséquences sur la sélection et l'utilisation des ferments, Sci. Aliments 20 (2000) 37–54.
- [4] Chamba J.F., Prost F., Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite, Lait 69 (1989) 417–431.
- [5] Chamba J.F., Prost F., Les fromages à pâte pressée cuite, in: Bourgeois C.M., Larpent J.P. (Eds), Microbiologie Alimentaire, Tome II, Lavoisier, Paris, France, 1996, pp. 353–381.
- [6] Collin J.C., Berdagué J.L., Dognin-Bergeret M., Grappin R., Affinage et qualité du gruyère de Comté. IV. Étude de la protéolyse, Lait 67 (1987) 229–318.
- [7] El Soda M., Desmazeaud M.J., Les peptidohydrolases du groupe Thermobacterium. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis* et *Lactobacillus bulgaricus*, Can. J. Microbiol. 28 (1982) 1181–1188.
- [8] Exterkate F.A., A dual directed control of cell wall proteinase in *Streptococcus cremoris* AM1: a possible mechanism of regulation during growth in milk, J. Dairy Sci. 68 (1985) 562–571.
- [9] Ezzat N., El Soda M., Desmazeaud M.J., Ismail A., Peptide hydrolases from the Thermobacterium group of lactobacilli. II. Physiological factors and enzyme productions, Milchwissenschaft 37 (1982) 666–668.
- [10] FIL-IDF, Détermination de la teneur en azote, Norme 20B, Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium, 1993.
- [11] Gagnaire V., Mollé D., Sorhaug T., Léonil J., Peptidases of dairy propionic acid bacteria, Lait 79 (1999) 43–57.
- [12] Grappin R., Beuvier E., Bouton Y., Pochet S., Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses, Lait 79 (1999) 3–22.

- [13] Haasnoot W., Stouten P., Venema D.P., High-performance liquid chromatography determination of the extent of proteolysis in Gouda cheese, *J. Chromatogr.* 483 (1989) 319–329.
- [14] Hipp N.J., Groves M.L., Custer J.H., Mc Meekin T.L., Separation of γ -casein, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 4928–4931.
- [15] Kuchroo C.N., Fox P.F., Soluble nitrogen in cheddar cheese: comparison of extraction procedures, *Milchwissenschaft* 37 (1982) 331–335.
- [16] Leaver J., Dalgeish D.G., The topography of bovin β -casein at an oil/water interface as determined from the kinetics of trypsin catalysed hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta.* 1041 (1990) 217–222.
- [17] Mohler Smith A., Nakai S., Classification of cheese varieties by multivariate analysis of HPLC profiles, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23 (1990) 53–58.
- [18] Pripp A.H., Shakeel-Ur-Rehman, Mc Sweeney P.L.H., Fox P.F., Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single-strain starters on proteolysis in miniature cheddar-type cheeses, *Int. Dairy J.* 9 (1999) 473–479.
- [19] Prost F., Chamba J.F., Effect of aminopeptidase activity of thermophilic lactobacilli on Emmentaler cheese characteristics, *J. Dairy Sci.* 77 (1994) 24–33.
- [20] Richoux R., Kerjean J.R., Caractérisation de l'aptitude technologique de souches pures de bactéries propioniques : test en mini fabrication de fromages à pâte cuite, *Lait* 75 (1995) 45–59.
- [21] Shakeel-Ur-Rehman, Pripp A.H., Mc Sweeney P.L.H., Fox P.F., Assessing the proteolytic and cheese ripening properties of single strains of *Lactococcus* in miniature cheeses, *Lait* 79 (1999) 361–383.
- [22] Valence F., Richoux R., Thierry A., Palva A., Lortal S., Autolysis of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheeses: first evidence by using species-specific lysis markers, *J. Dairy Res.* 65 (1998) 609–620.