



HAL
open science

**Caractérisation d'une aminopeptidase chez
Streptococcus cremoris AM2 et d'une α -galactosidase
chez Leuconostoc lactis CNRZ 1091**

Clair-Yves Boquien, M.J. Desmazeaud, G. Corrieu

► **To cite this version:**

Clair-Yves Boquien, M.J. Desmazeaud, G. Corrieu. Caractérisation d'une aminopeptidase chez Streptococcus cremoris AM2 et d'une α -galactosidase chez Leuconostoc lactis CNRZ 1091. Le Lait, 1989, 69 (1), pp.71-81. hal-00929150

HAL Id: hal-00929150

<https://hal.science/hal-00929150>

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.

Article de recherche

Caractérisation d'une aminopeptidase chez *Streptococcus cremoris* AM2 et d'une α -galactosidase chez *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091

C.Y. Boquien¹, M.J. Desmazeaud² et G. Corrieu¹

¹INRA, Laboratoire de Génie des procédés biotechnologiques agro-alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France

²INRA, Laboratoire de microbiologie laitière, 78350 Jouy-en-Josas, France

(reçu le 17-2-1988, accepté le 15-9-1988)

Résumé — L'utilisation de galeries Api Zym a permis de mettre en évidence des enzymes spécifiques de bactéries lactiques. *Streptococcus cremoris* AM2 possède une aminopeptidase active sur le substrat histidyl-phénylalanine- β -naphtylamide et *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 est caractérisée par la présence d'une α -galactosidase active sur le substrat paranitrophénol- α -galactose. Les 2 enzymes ont une cinétique conforme à l'équation de Michaelis. La mesure des 2 activités enzymatiques a été optimisée en déterminant le meilleur mode de conservation des bactéries (cellules fraîches pour *S. cremoris* AM2 et cellules perméabilisées pour *L. lactis* CNRZ 1091) et les optima de pH (7 pour l'aminopeptidase et 6,5 pour l'osidase) et de température (40°C dans les 2 cas). Les caractéristiques cinétiques apparentes de ces 2 enzymes ont aussi été déterminées : pour l'aminopeptidase et l' α -galactosidase, les K_m sont respectivement de 0,17 et 0,73 mM et les V_{max} de 0,6 et 90 pkat/10⁷ cfu.ml⁻¹.

aminopeptidase – α -galactosidase – *S. cremoris* – *Leuconostoc lactis*

Summary — Characterization of an aminopeptidase of *Streptococcus cremoris* AM2 and an α -galactosidase of *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091. The use of Api Zym system has permitted detection of specific enzymes of lactic acid bacteria. *Streptococcus cremoris* AM2 possesses an aminopeptidase hydrolysing the substrate histidyl-phenylalanine- β -naphthylamide and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 is characterized by an α -galactosidase hydrolysing the substrate paranitrophenol- α -galactose. The 2 enzymes have kinetics according to the equation of Michaelis. The measurement of the 2 enzymes activity has been optimized by determining the best method for storing the bacteria (resting-cells for *S. cremoris* AM2 and permeabilized cells for *L. lactis* CNRZ 1091) and the optima for pH (7 for aminopeptidase and 6.5 for α -galactosidase) and temperature (40 °C for both). Apparent kinetic constants of the 2 enzymes have been determined : K_m are 0.17 and 0.73 mM and V_{max} 0.6 and 90 pkat/10⁷ cfu.ml⁻¹ for the aminopeptidase and the α -galactosidase, respectively.

aminopeptidase – α -galactosidase – *S. cremoris* – *Leuconostoc lactis*

Introduction

Les bactéries lactiques mésophiles, utilisées en fromageries, appartiennent aux genres *Streptococcus* et *Leuconostoc*. Bien que ces bactéries soient taxonomiquement très proches, les souches diffèrent cependant par certaines enzymes spécifiques (Desmazeaud et Zevaco, 1979; Hwang *et al.*, 1982). Mais aucun travail systématique de recherche de ces enzymes n'a été réalisé.

L'emploi des galeries Api vise à détecter des activités enzymatiques spécifiques. A l'aide des galeries Api Zym, la comparaison des profils enzymatiques a facilité l'identification rapide de champignons filamenteux, notamment des *Penicillium* (Bridge et Hawksworth, 1984). De la même façon, des différences d'activités enzymatiques ont été notées entre les bactéries lactiques et certains coliformes, ainsi qu'entre *Streptococcus lactis* et *Streptococcus faecalis* (Lee *et al.*, 1986).

Dans cette optique, le présent travail rapporte l'utilisation de galeries Api pour la recherche d'enzymes spécifiques de souches de *Streptococcus* et *Leuconostoc*. Une aminopeptidase et une α -galactosidase, spécifiques respectivement de

Streptococcus cremoris AM2 et de *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091, ont été mises en évidence et caractérisées par leurs constantes cinétiques, leur température et leur pH optimum.

Matériels et Méthodes

Souches bactériennes

Vingt streptocoques mésophiles appartenant à la collection du CNRZ (INRA, Jouy-en-Josas) (Tableau I) ont été comparés. Les souches étaient conservées à -18°C dans du lait écrémé tournesolé (1 g de Bacto-litmus (Difco) par litre de lait).

L. lactis CNRZ 1091 était conservé à -18°C dans du milieu MRS (De Man *et al.*, 1960).

Trente-trois autres souches de *Leuconostoc*, appartenant aussi à la collection du CNRZ et conservées sur le même milieu, ont été utilisées pour la recherche d'une activité α -galactosidase.

Mise en évidence d'activités enzymatiques

Les 20 streptocoques mésophiles et *L. lactis* CNRZ 1091 étaient cultivés sur le milieu de Desmazeaud et Vassal (1979). Après incubation pendant une nuit à 30°C , les cellules étaient centrifugées à 4°C (20 min, 4 100 g) et

Tableau I. Liste des streptocoques lactiques mésophiles testés avec les galeries Zym peptidases et Zym osidase.

<i>S. lactis</i>	<i>S. cremoris</i> <i>diacetylactis</i>	<i>S. lactis</i> ssp
29	1P5	DRC1
C2	ML1	DRC2
C6	E8	DRC3
T1	KH	723
304	K	CLM
ML8	HP	A154
	158	
	AM2	

lavées 2 fois avec du tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7,5). Leurs systèmes enzymatiques étaient recherchés sur galeries Api Zym (Zym Peptidases AP1, 2, 3, 4, 5, 6 et Zym Osidase) obtenues auprès du laboratoire de recherche Api (Api System, France).

Mesure de l'activité aminopeptidasique

Le substrat utilisé était l'histidyl-phénylalanine- β -naphthylamide (Bachem, Suisse); il sera noté His-Phé-na. Après hydrolyse, le produit de la réaction enzymatique (naphthylamine) était dosé par colorimétrie (Goldberg et Rutenburg, 1958; Sigma, bulletin technique n° 251, 1983).

La souche *S. cremoris* AM2 était cultivée et récoltée dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7) comme décrit ci-dessus. La concentration en bactéries était ajustée à environ 2.10^8 cfu.ml⁻¹ (colonie formant une unité.ml⁻¹), le dénombrement étant réalisé sur le milieu de Huggins et Sandine (1984). Cette suspension bactérienne était considérée comme la préparation d'enzyme.

Dans un tube à hémolyse, 0,5 ml de substrat (0,33 mM) et 0,5 ml de suspension bactérienne étaient mélangés. Des témoins contenant uniquement le substrat ou l'enzyme étaient réalisés en parallèle.

Après une heure d'incubation à 35°C, 0,5 ml d'acide chlorhydrique (2N) était ajouté pour arrêter la réaction. La solution était ensuite agitée doucement. Une centrifugation à 1 100 g pendant 15 min était nécessaire pour éliminer les bactéries. Le dosage se poursuivait par addition successive des réactifs suivants :

- nitrite de sodium (0,5 ml à 0,2% poids/vol). Après agitation, une attente de 3 min était nécessaire;
- sulfamate d'ammonium (1 ml à 0,5% poids/vol). Après agitation, une attente de 3 min était nécessaire;
- N-naphtyl-éthylène-diamine (2 ml à 0,5 mg.ml⁻¹ d'éthanol à 95%). Après 45 min d'attente, l'absorbance de la solution violette était lue au spectrophotomètre Cary (Varian) à 560 nm.

Mesure de l'activité α -galactosidasique

Le substrat paranitrophényl- α -galactose (Fluka, Suisse), qui sera noté PNP- α -gal, était dissous dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 6,5). Après hydrolyse, le produit de la réaction

enzymatique (paranitrophénol) était dosé par colorimétrie (Citti *et al.*, 1965; Fisher *et al.*, 1985).

Après une incubation de 15 h dans le milieu de Desmazeaud et Vassal (1979), les cellules étaient récoltées comme ci-dessus mais dans du tampon phosphate à pH 6,5. La concentration en bactéries était ajustée à environ 2.10^6 cfu.ml⁻¹, le dénombrement étant réalisé sur le milieu d'Elliker *et al.* (1956).

Les cellules de *L. lactis* CNRZ 1091 étaient perméabilisées selon la méthode de Miozzari *et al.* (1978). Du triton X 100 dilué 10 fois était ajouté à raison de 0,5% (v/v) à la suspension bactérienne qui était ensuite congelée à -18°C pendant au moins 15 h. Après décongélation, les échantillons étaient considérés comme les préparations enzymatiques.

Dans un tube à hémolyse, 1 ml de substrat et 0,5 ml de suspension bactérienne étaient mélangés. Des témoins contenant uniquement le substrat ou l'enzyme étaient réalisés en parallèle.

Après une incubation pendant 30 min à 35°C, 0,5 ml de carbonate de sodium (1 M) était ajouté pour arrêter la réaction. La suspension était ensuite centrifugée à 1 100 g pendant 15 min. L'absorbance de la solution jaune était lue au spectrophotomètre Cary à 405 nm.

Caractérisation des activités enzymatiques

Des solutions standard de β -naphthylamine (Sigma) et de paranitrophénol (Sigma) étaient utilisées pour calculer les coefficients d'extinction molaire. Après addition des réactifs de dosage, des spectres d'absorption des solutions colorées étaient tracés sur spectrophotomètre Cary (Varian) entre 300 et 650 nm afin de déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale.

L'influence de plusieurs paramètres (mode de conservation des cellules, concentration en substrat, temps d'incubation, concentration en enzymes, température d'incubation et pH) sur les 2 activités enzymatiques a été étudiée.

Mode de conservation des cellules. Les activités enzymatiques étaient déterminées sur des cellules ayant subi les traitements suivants : cellules conservées 24 h à 2°C, cellules congelées 24 h à -18°C, cellules additionnées de glycérol à 1%, congelées 24 h à -18°C, cellules perméabilisées selon la méthode de Miozzari

zari *et al.* (1978), cellules fraîches (témoin).

Deux essais de perméabilisation des cellules de *L. lactis* CNRZ 1091 avec congélation à -80°C pendant 5 min ou à -18°C pendant 15 min ont été réalisés.

Influence de la concentration en substrat. Les activités enzymatiques étaient mesurées pour des concentrations variables en substrat (pour l'His-Phé-na : de 0,04 mM à 0,33 mM, puis de 0,125 mM à 1 mM dans une seconde expérience et pour le PNP- α -gal : de 0,5 mM à 4 mM).

Influence du temps d'incubation. Différents temps d'incubation étaient testés : 1, 2, 3 et 4 h pour l'activité de l'aminopeptidase, 5, 10, 20 et 30 min pour l'activité de l'osidase.

Influence de la concentration en bactéries. Les activités enzymatiques étaient mesurées avec des suspensions bactériennes obtenues par dilution d'une solution mère dans les rapports 3/4, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16.

Influence de la température d'incubation et du pH du tampon. Les valeurs testées étaient 25, 30, 35, 40 et 45°C pour la température et 6, 6,5, 7, 7,5 et 8 pour le pH.

Activité enzymatique des streptocoques et des *Leuconostoc*

Les activités aminopeptidasiques de *L. lactis* CNRZ 1091 et des 20 streptocoques (Tableau I) ont été comparées.

L'activité α -galactosidase a été recherchée chez *S. cremoris* AM2 et les 33 souches de *Leuconostoc* : après 30 min d'incubation, suivant que la solution finale était incolore ou jaune, le résultat est jugé négatif ou positif.

Résultats

Recherche de l'activité aminopeptidasique

Les résultats obtenus sur galeries Zym Peptidases montrent que pour un substrat donné, toutes les souches ont une activité enzymatique du même ordre de grandeur.

Deux souches (*S. cremoris* AM2 et *S. lactis* 304) possèdent une forte activité sur le substrat His-Phé-na, alors que les autres souches présentent des réponses faibles ou négatives. Pour la suite de

l'étude, nous avons étudié *S. cremoris* AM2 qui a la plus forte activité enzymatique.

Recherche de l'activité osidasique

Les 20 souches de streptocoques testées présentent les mêmes activités osidasiques puisqu'elles possèdent toutes une β -galactosidase, une phospho- β -galactosidase et une acétyl- β -glucosaminidase.

Par ailleurs, sur cette même galerie Zym Osidase, la souche *L. lactis* CNRZ 1091 a révélé la présence d'une α -galactosidase, active sur le substrat paranitro-phénol- α -galactose.

Caractérisation des activités enzymatiques

Le maximum d'absorption du produit de la réaction, après addition des réactifs, se situe à environ 580 nm pour la naphtylamine et à 400 nm pour le paranitrophénol. Ce sont les longueurs d'onde utilisées par la suite pour effectuer les mesures.

L'absorbance des solutions colorées est proportionnelle au nombre de micromoles de produit. Les coefficients d'extinction molaire sont de 10,1 et $9,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivement pour la naphtylamine après addition des réactifs et pour le paranitrophénol.

Dans les conditions de nos dosages, une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse une mole de substrat (donc qui libère une mole de produit) par seconde. Les résultats obtenus sont de l'ordre du picokatal (pkat) et du nanokatal (nkat), respectivement pour les activités aminopeptidasique et osidasique.

Le témoin contenant les bactéries (sans substrat) a une activité nulle. L'absorbance à 580 nm (notée DO_{580}) du témoin contenant l'His-Phé-na (sans bac-

téries) est toujours d'environ 0,008 ($\pm 0,002$). La DO_{400} du témoin contenant le PNP- α -gal est d'environ 0,090 ($\pm 0,010$). Ces valeurs étaient soustraites des DO mesurées après action des enzymes.

Influence du mode de conservation. L'aminopeptidase présente une activité optimale pour des cellules fraîches (Tableau II). Elle apparaît comme une enzyme très instable, résistant mal à la conservation à $+2^{\circ}\text{C}$ ou à -18°C . L'addition de glycérol est quasiment sans effet. La perméabilisation réduit presque totalement son activité.

Au contraire, l'activité osidasique est optimale avec des cellules perméabilisées (Tableau II). Les cellules fraîches, conservées à $+2^{\circ}\text{C}$ ou congelées en présence de glycérol présentent une activité très faible. Les cellules perméabilisées ont la même activité α -galactosidasique selon qu'elles sont congelées pendant 15 h à -18°C , pendant 15 min à -18°C ou pendant 5 min à -80°C .

Influence de la concentration en substrat. L'activité enzymatique augmente avec la concentration en substrat selon une ciné-

tique michaelienne (Figs. 1 et 2). L'activité aminopeptidasique baisse lorsque la concentration en substrat devient supérieure à 0,35 mM : elle n'est plus que le tiers de l'activité maximale lorsque la concentration en substrat atteint 1 mM (résultats non montrés). En conséquence, la concentration en substrat retenue pour le dosage aminopeptidasique est de 0,33 mM.

L'activité osidasique est maximale à 4 mM lorsqu'est atteinte la zone de plateau. C'est la concentration qui a été choisie pour la mesure de l'activité osidasique.

La représentation de Hanes (1932) (S/V_i en fonction de S) a été utilisée pour calculer les constantes cinétiques des enzymes (Figs. 1 et 2). Les constantes de Michaelis apparentes (K_m) sont égales à 0,17 mM à pH 7 et 40°C pour l'aminopeptidase et à 0,73 mM à pH 6,5 et 40°C pour l'osidase. Les vitesses maximales apparentes (\dot{V}_{max}) sont respectivement de 0,6 et 90 pkat par 10^7 bactéries, pour l'aminopeptidase et l'osidase.

L' α -galactosidase a une vitesse maximale apparente environ 150 fois supé-

Tableau II. Influence du mode de conservation des bactéries sur les activités aminopeptidasique de *S. cremoris* AM2 et osidasique de *L. lactis* CNRZ 1091. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale.

Traitement et conservation des cellules	Activité de l'aminopeptidase	Activité de l'osidase
Cellules fraîches	100	3
Conservation 24h à $+2^{\circ}\text{C}$	30	3
Congélation 24h à -18°C	47	21
Congélation 24h à -18°C en présence de glycérol à 1%	52	3
Perméabilisation au triton X 100	3	100

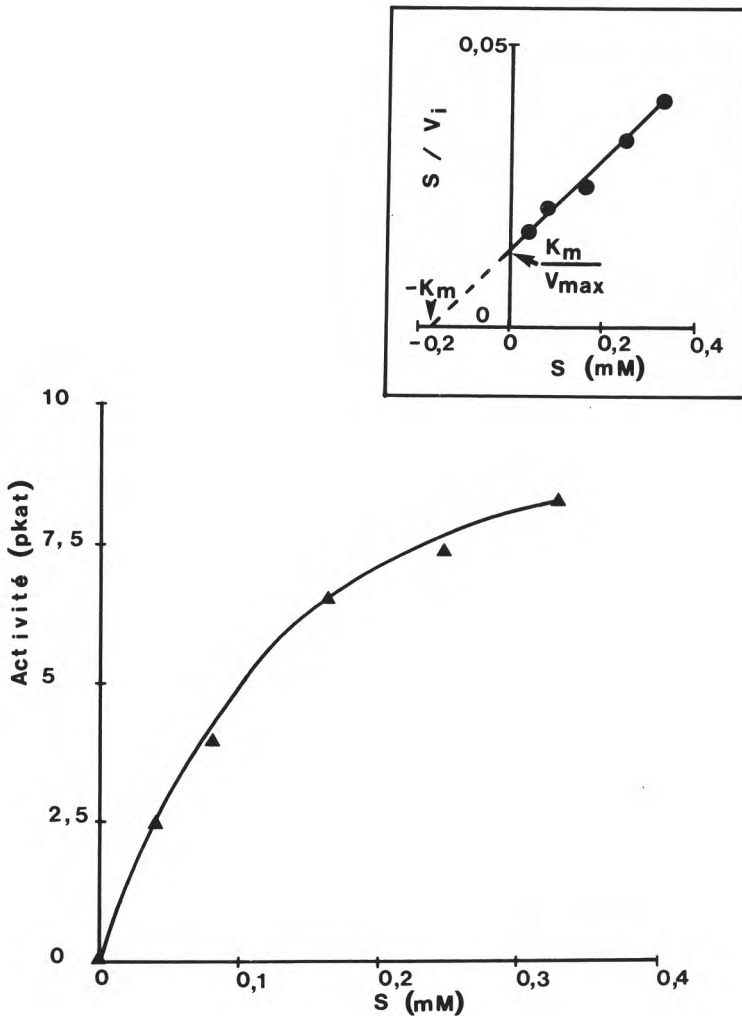


Fig. 1. Effet de la concentration en His-Phé-na sur l'activité aminopeptidasique de *S. cremoris* AM2. La représentation de Hanes (S/V_i en fonction de S) est figurée dans l'encart.

rieure à celle de l'aminopeptidase. En revanche, les produits des dosages enzymatiques ont des coefficients d'extinction molaire voisins ($9,1$ et $10,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Pour le dosage de l'activité aminopeptidasique, les suspensions bactériennes sont

donc environ 100 à 150 fois plus concentrées que pour l'activité osidasique.

Influence du temps d'incubation et de la concentration en bactéries. L'évolution des activités enzymatiques en fonction du temps d'incubation et de la concentration

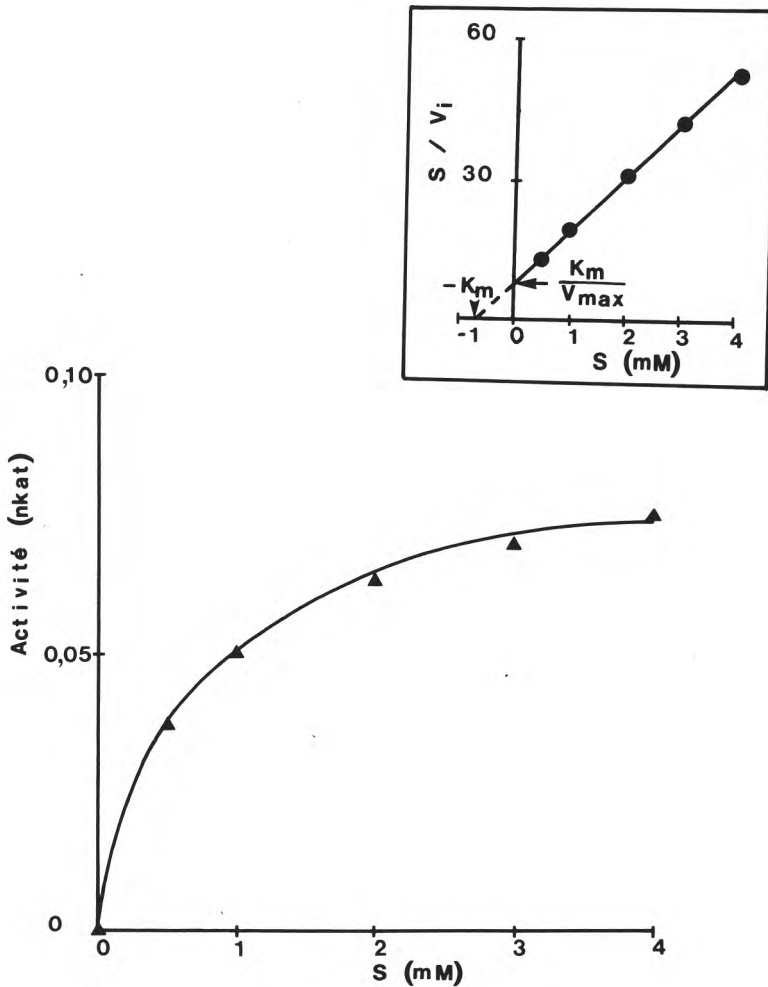


Fig. 2. Effet de la concentration en paranitrophénol- α -galactose sur l'activité osidasique de *L. lactis* CNRZ 1091. La représentation de Hanes (S/V_i en fonction de S) est figurée dans l'encart.

en bactéries est linéaire tant que la DO reste inférieure à 1,1 pour l'activité de l'aminopeptidase et à 1,3 pour l'activité de l'osidase. Ces linéarités laissent penser que les réactions enzymatiques sont de nature michaélienne.

Influence de la température d'incuba-

tion et du pH. Les conditions optimales de détermination des activités aminopeptidasique et osidasique sont respectivement :

- température 40°C et pH 7 (Figs. 3 et 4);
- température 40°C et pH 6,5 (Figs. 3 et 4).

A 25°C, les activités aminopeptidase et osidasique sont respectivement égales à 8 et 46% des activités maximum.

A pH 6, l'aminopeptidase a une activité égale à 33% du maximum. L'activité osidasique mesurée à pH 7,5 est égale à 63% du maximum.

En général, l'activité aminopeptidase est plus sensible aux variations de température et de pH que l'activité osidasique.

Activité des *Leuconostoc* et des *Streptococcus*

L'activité aminopeptidase d'une suspension cellulaire de *L. lactis* CNRZ 1091 est négligeable, car toujours inférieure à 0,1 pkat/unité DO₅₅₀. Pour les 20 souches de streptocoques étudiées, l'activité aminopeptidase varie de 1 pkat/unité DO₅₅₀ (11 souches) à 2,5 pkat/unité DO₅₅₀

(7 souches) tandis que celle de *S. cremoris* AM2 est de 17 pkat/unité DO₅₅₀.

Cela confirme les résultats des galeries Api Zym AP, à savoir que *S. cremoris* AM2 possède une activité aminopeptidase particulièrement importante.

Parmi les 33 souches de *Leuconostoc* testées, 17 présentent une activité osidasique. *S. cremoris* AM2 n'en possède pas (résultats non montrés).

Discussion

Recherche d'enzymes spécifiques

D'après les galeries Zym Peptidases, tous les streptocoques lactiques mésophiles ont des profils aminopeptidasiques semblables, ce qui confirme leur grande parenté génotypique. Pour un même test, les différences observées entre les souches s'expliquent en partie par la

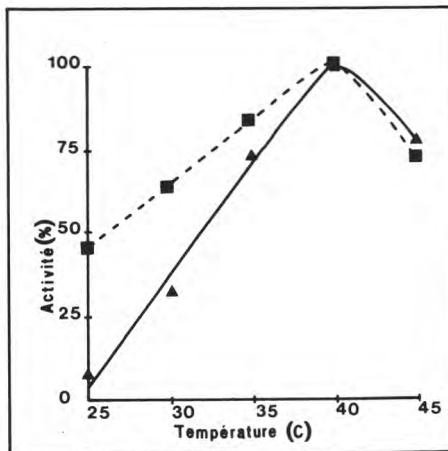


Fig. 3. Effet de la température d'incubation sur les activités aminopeptidasique (▲) de *S. cremoris* AM2 et osidasique (■) de *L. lactis* CNRZ 1091.

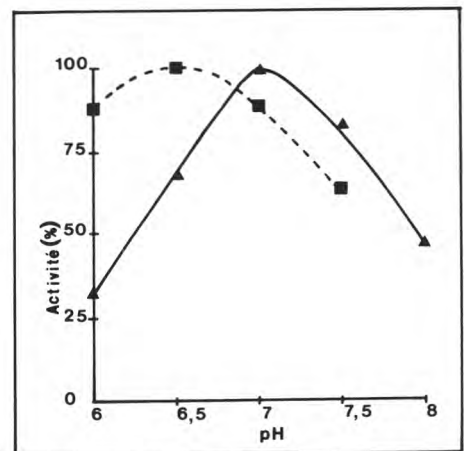


Fig. 4. Effet du pH sur les activités aminopeptidasique (▲) de *S. cremoris* AM2 et osidasique (■) de *L. lactis* CNRZ 1091.

méthode employée : en fin de culture, le pH final est de 4,5 ($\pm 0,2$); à ce pH, l'altération des enzymes varie selon les souches, la régulation du pH interne n'étant pas identique pour chacune d'entre elles (Konings et Otto, 1983).

A l'aide des galeries Api, Lee *et al.* (1986) ont noté la présence d'une α -galactosidase chez plusieurs espèces de lactobacilles mais ils n'ont pas constaté l'existence de cette enzyme chez les souches de *Leuconostoc* qu'ils utilisaient.

Caractérisation de l'activité aminopeptidasique

La baisse d'activité de l'aminopeptidase pour une concentration en His-Phéna supérieure à 0,33 mM peut s'expliquer par une inhibition par excès de substrat (Murray, 1930).

La constante de Michaelis apparente (K_m) pour cette enzyme a été mesurée avec des bactéries fraîches. Sa valeur est faible (0,17 mM), comparée à celle d'une peptidase purifiée 200 fois de *S. cremoris* ($K_m > 1$ mM, selon Hwang *et al.*, 1982) ou d'une aryl-peptidyl-amidase de *Lactobacillus casei* ($K_m > 0,76$ mM, selon El Soda et Desmazeaud, 1981). L'aminopeptidase de *S. cremoris* AM2 présente donc une bonne affinité pour son substrat. En revanche, Meyer et Jordi (1987) ont calculé des K_m apparents de 6 et 9,8 10^{-2} mM pour des dipeptidyl-aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus lactis*.

Ces dipeptidyl-aminopeptidases ont des optima de pH et de température, respectivement de 7 et de 45°C. L'activité aminopeptidasique de *S. cremoris* AM2 est proche de celles de 2 aminopeptidases de *S. lactis* ssp *diacetylactis* qui présentent des pH optimum de 6,5 et 7 et une température optimum de 35°C (Desmazeaud et Zevaco, 1979).

Les cellules perméabilisées au triton X 100 présentent une faible activité aminopeptidasique. Il se peut que le triton X 100 soit un inhibiteur de l'aminopeptidase ou qu'il provoque des changements de structure membranaire rendant impossible la réaction enzymatique. Au contraire, la congélation en présence de glycérol conserve les cellules relativement intactes ainsi que l'activité aminopeptidasique. Il semblerait donc que l'aminopeptidase soit une enzyme liée aux enveloppes. De même, Exterkate (1984) a mesuré l'activité d'une alanyl-aminopeptidase et de 2 endopeptidases sur des cellules de *S. cremoris* traitées au butanol. L'activité de la première enzyme n'est pas augmentée, contrairement à celle des 2 endopeptidases. L'auteur en conclut à une localisation de l'alanyl-aminopeptidase dans les enveloppes cellulaires.

Cependant, les traitements sévères (lyse enzymatique (lysozyme) ou broyage aux ultra-sons) appliqués aux cellules rendent les résultats difficiles à exploiter. Exterkate (1984) a d'ailleurs souligné la difficulté de localiser précisément ce type d'aminopeptidase chez les bactéries lactiques.

D'un point de vue physiologique, l'aminopeptidase participe vraisemblablement à l'hydrolyse des protéines en acides aminés et en peptides, nécessaires à la nutrition azotée de *S. cremoris* AM2 (Desmazeaud, 1983).

Caractérisation de l'activité osidasique

L' α -galactosidase de *L. lactis* CNRZ 1091 (K_m apparent de 0,73 mM, pH optimum de 6,5, température optimale de 40°C) est très différente de celle de *Candida javanica*, purifiée 20 fois, caractérisée par un K_m apparent de 11 mM et des optima de pH et de température de 4 et 70°C (Cavazzoni *et al.*, 1987).

L'activité osidasique est plus importante sur des cellules dont la paroi est fragilisée par perméabilisation ou dans une moindre mesure, par congélation. Ces traitements rendent les cellules perméables aux macromolécules dont la masse moléculaire est inférieure à 70 000 (Miozzari *et al.*, 1978). Les enzymes sortent réellement des cellules et les substrats exogènes rentrent dans le cytoplasme et deviennent alors accessibles aux enzymes intracellulaires. La congélation en présence de glycérol, agent de conservation des bactéries, n'améliore pas l'activité osidasique globale. Ces résultats laissent penser à une localisation intracellulaire de l' α -galactosidase.

Les différentes conditions de congélation (5 min à -80°C ou 15 h à -18°C) sont sans effet sur l'activité osidasique. Apparemment, c'est le choc dû à la congélation et à la décongélation, en présence de triton X 100, qui perméabilise les cellules, indépendamment du temps de congélation.

Nos résultats sont comparables à ceux décrivant l'activité spécifique de la β -galactosidase d'une souche de *S. lactis* (Citti *et al.*, 1965) ou de *Lactobacillus acidophilus* (Fischer *et al.*, 1985). Cette enzyme a été caractérisée sur des cellules traitées au mélange toluène-acétone et avec des cellules non traitées. Dans tous les dosages, les cellules traitées ont une activité plus forte. Le toluène et l'acétone augmentent la perméabilité des cellules, comme le triton X 100.

Des osidasiques particulières ont déjà été mises en évidence chez d'autres souches de bactéries lactiques : une tréhalase et une maltase chez *S. lactis* et *S. lactis* ssp *diacetylactis* (Deibel et Seeley, 1974), une α -galactosidase chez des lactobacilles (Lee *et al.*, 1986). La présence d'une α -galactosidase chez des *Leuconostoc* est à mettre en parallèle avec ces résultats. Cependant, le rôle physiologique de ces

osidasiques n'a jamais été élucidé.

L'activité α -galactosidase n'est spécifique ni du genre, ni d'une espèce de *Leuconostoc* puisqu'elle est présente chez à peu près 50% des *Leuconostoc* étudiés, quelle que soit leur espèce.

Conclusion

Cette étude a permis la mise en évidence d'enzymes spécifiques de souches de bactéries lactiques mésophiles, telles que l'aminopeptidase pour *S. cremoris* AM2 et l' α -galactosidase pour *L. lactis* CNRZ 1091. Ainsi, une meilleure connaissance a été apportée sur des souches utilisables en industrie fromagère.

Remerciements

Cette étude a été financée par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur (Contrat N°86 T 0640). Nous remercions J.J. Devoyod pour les souches de *Leuconostoc*.

Références

- Bridge P.D. & Hawksworth D.L. (1984) The API ZYM enzyme testing system as an aid to the rapid identification of *Penicillium* isolates. *Microbiol. Sci.* 1, 232-234
- Cavazzoni V., Adami A. & Craveri R. (1987) α -galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 555-559
- Citti J.E., Sandine W.E. & Elliker P.R. (1965) β -galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 89, 937-942
- Deibel R.H. & Seeley Jr H.W. (1974) Family *Streptococcaceae*. In : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. (R.E. Buchanan & N.E. Gibbons, eds.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 490-509
- De Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135
- Desmazeaud M.J. & Vassal L. (1979) Activité

- protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles. Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait* 59, 327-344
- Desmazeaud M.J. & Zevaco C. (1979) Isolation and general properties of two intracellular aminopeptidases of *Streptococcus diacetylactis*. *Milchwissenschaft* 34, 606-610
- Desmazeaud M.J. (1983) L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait* 63, 267-316
- Elliker P.R., Anderson A.W. & Hannesson G. (1956) An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 39, 1611-1612
- El Soda M. & Desmazeaud M.J. (1981) General properties of a new ribosomal aryl-peptidyl amidase in *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* 45, 1693-1700
- Exterkate F.A. (1984) Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 177-183
- Fisher K., Johnson M.C. & Ray B. (1985) Lactose hydrolysing enzymes in *Lactobacillus acidophilus* strains. *Food Microbiol.* 2, 23-29
- Goldberg J.A. & Rutenburg A.M. (1958) The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. *Cancer* 11, 283-291
- Hanes C.S. (1932) In : *Enzymes* (M. Dixon & E.C. Webb, eds.), Longman Group Ltd, London, p.62
- Huggins A.R. & Sandine W.E. (1984) Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.* 67, 1674-1679
- Hwang I.K., Kaminogawa S. & Yamauchi K. (1982) Kinetic properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. *Agric. Biol. Chem.* 46, 3049-3053
- Konings W.N. & Otto R. (1983) Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 49, 247-257
- Lee B.H., Hache S. & Simard R.E. (1986) A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *J. Ind. Microbiol.* 1, 209-217
- Meyer J. & Jordi R. (1987) Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 70, 738-745
- Miozzari G.F., Niederberger P. & Hutter R. (1978) Permeabilization of microorganisms by Triton X-100. *Anal. Biochem.* 90, 220-233
- Murray D.R.P. (1930) In : *Enzymes* (M. Dixon & E.C. Webb, eds.), Longman Group Ltd, London, p. 129