

Cheddar, quelles bactéries préfères-tu?

Par **GISÈLE LAPOINTE**, professeure titulaire du Département des sciences des aliments et de nutrition de l'Université Laval, et **DENIS ROY**, titulaire de la Chaire de recherche du Canada en biotechnologies des cultures lactiques d'intérêt laitier et probiotique et de la Chaire de recherche CRSNG – industrie laitière en technologie et typicité fromagère

- Peut-on déterminer quelles bactéries sont les plus utiles à la maturation d'un bon fromage cheddar? Des microbiologistes se sont penchés sur la question.



La fabrication du fromage cheddar repose sur plusieurs facteurs qui doivent rester en équilibre pour assurer sa qualité. Un bon fromager choisit avec soin le traitement thermique du

lait et les ferments qu'il utilise, tout en contrôlant la teneur en eau et la quantité de sel du fromage de même que la température d'affinage. Par contre, il lui est beaucoup plus difficile de contrôler les populations bactériennes qui se développent pendant la maturation et qui pourraient faire pencher

la balance en fonction de leurs activités métaboliques... Vont-elles donner au fromage sa saveur caractéristique ou vont-elles créer des défauts qui déclasseront le fromage? Quelles bactéries sont présentes et comment prédire leurs effets?

LE CHEDDAR EN BREF

Au Canada, les ferments utilisés dans la fabrication du fromage cheddar sont surtout composés de lactocoques (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ou *L. lactis* ssp. *lactis*), des bactéries qui vont rapidement acidifier le lait pour aider à former le caillé de fromage en combinaison avec de la présure.

Les lactobacilles (*Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. parabuchneri*, par exemple) sont des bactéries qui se développent préférentiellement grâce à cette acidité et aux autres composés libérés dans le lait par les lactocoques, comme les peptides issus de la dégradation des protéines laitières. Ils

EN UN CLIN D'OEIL

CHAMP D'APPLICATION : Fabrication du fromage cheddar

OBJET DE LA RECHERCHE/ÉLÉMENTS D'INNOVATION : Maturation du fromage cheddar : mieux comprendre l'impact de la succession et de l'activité des flores secondaires.

RETOMBÉES POTENTIELLES : Améliorer et standardiser la qualité des fromages par un meilleur contrôle de l'affinage.

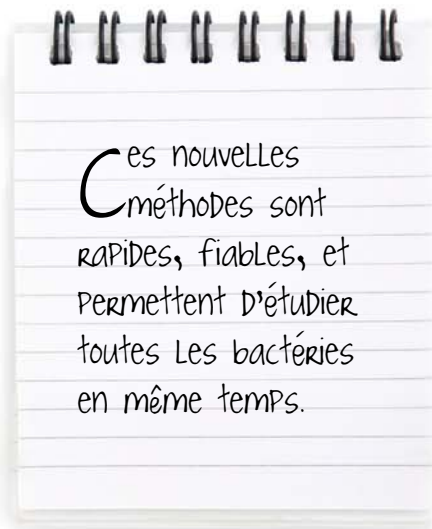
RECHERCHE SUBVENTIONNÉE PAR : CRSNG, Agropur coopérative, Fromagerie Damafro inc., Les Producteurs laitiers du Canada, Novalait inc., Parmalat Canada, Saputo inc. et Université Laval.

POUR EN SAVOIR DAVANTAGE : Denis Roy : denis.roy@inaf.ulaval.ca et Gisèle LaPointe : gisele.lapointe@fsaa.ulaval.ca.

libèrent et utilisent des acides aminés à partir des peptides qui sont responsables de la saveur du fromage. Les lactobacilles ne sont pas nécessairement ajoutés par le fromager, bien qu'il puisse décider d'en ajouter afin de contrôler davantage l'affinage et de reproduire certaines caractéristiques. Ils sont retrouvés dans le lait ou dans la fromagerie et vont se développer après le ferment, d'où l'appellation « flore secondaire ». Cette flore se développe principalement pendant la maturation, alors que les lactocoques ont plutôt tendance à décliner. Il est donc facile de supposer que c'est la flore secondaire qui complète le travail de maturation, mais comment le prouver?

L'APPROCHE MOLÉCULAIRE

Les méthodes moléculaires permettent l'étude directe du matériel génétique des bactéries sans passer par des milieux de culture. Celles-ci aident à mieux comprendre quelles sont les espèces présentes lors de la maturation (approche génomique),



mais surtout, lesquelles sont vraiment actives (approche transcriptomique). Ces nouvelles méthodes sont rapides, fiables, et permettent d'étudier toutes les bactéries en même temps. Dans le cadre de la Chaire industrielle de recherche en technologie et typicité fromagère, Denis Roy, en collabora-

tion avec Gisèle LaPointe et la candidate au doctorat, Émilie Desfossés-Foucault, ont appliqué ces nouvelles techniques. Ces dernières ont servi à mettre à l'étude la contribution des lactobacilles par rapport à celle des lactocoques pendant la maturation du fromage cheddar en fonction des traitements thermiques du lait et de la température de maturation. Dans le cadre de sa thèse de doctorat au laboratoire de génétique microbienne de l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF), Émilie Desfossés-Foucault a utilisé les outils moléculaires suivants :

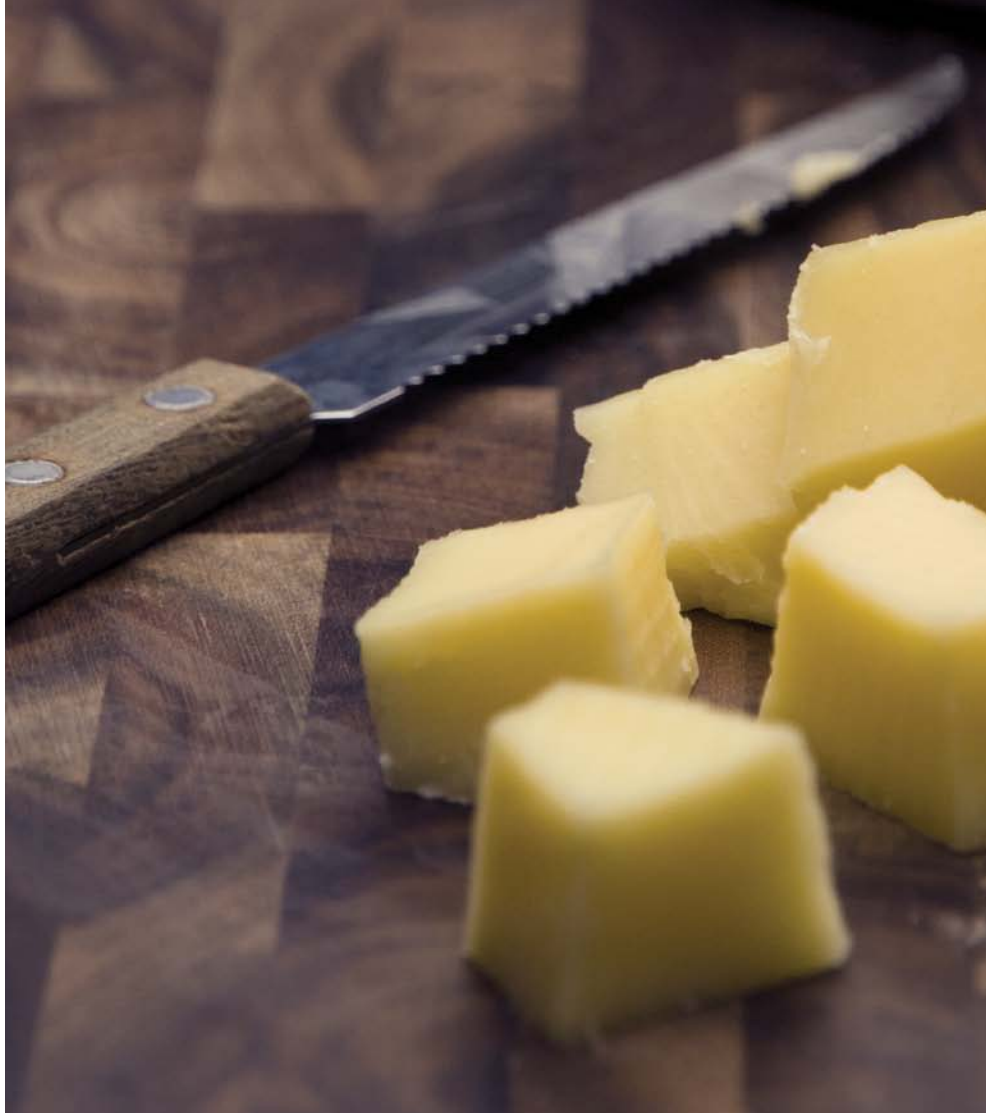
1. **Les banques de clones** – celles-ci ont servi à comprendre quelles bactéries sont présentes (abondance) et lesquelles sont actives dans des fromages commerciaux canadiens en fonction du temps de maturation;
2. **Le séquençage multilocus (c'est-à-dire de plusieurs gènes différents)** – cette technique a démontré la diversité des souches d'un lactobacille connu pour son rôle important



pendant la maturation, *Lactobacillus paracasei*. Connaître la diversité de cette bactérie permet de choisir quelle souche possède le meilleur avantage technologique pour le développement d'un bon cheddar;

3. **La pcr quantitative** – celle-ci a mesuré précisément l'évolution (abondance et activité) des différentes bactéries pendant la maturation afin de déterminer lesquelles sont les plus importantes.

Mais avant de pouvoir employer ces techniques, il faut réussir à extraire tout le matériel génétique des bactéries et, en fonction de ce que l'on veut obtenir comme information, il faut savoir quelle partie extraire. En effet, il y a deux parties au matériel génétique: l'ADN, qui est le code de la vie et qui reste stable, peu importe les conditions, et l'ARN, qui est produit lorsque la bactérie a besoin de s'adapter à son milieu. Ce dernier est donc un meilleur marqueur de l'activité (surtout pour dire qui est actif et de quelle façon), alors que l'ADN, lui, peut servir à déterminer qui est présent et en quelle quantité (abondance). Dans le cas qui nous occupe, les deux sont intéressants, mais l'ARN étant



le
 producteur
 de
lait
 québécois



beaucoup plus instable et sensible aux conditions du milieu, il est aussi beaucoup plus difficile à extraire et à conserver intact. D'ailleurs, il est possible de retransformer l'ARN en ADN tout de suite après l'extraction pour éviter sa dégradation : c'est ce qu'on appelle une rétrotranscription en ADN complémentaire (ADNc).

Cette tâche importante étant accomplie, les scientifiques peuvent utiliser tous leurs outils moléculaires pour améliorer leur compréhension de la maturation du cheddar.

BACTÉRIES DU CHEDDAR : ABONDANCE OU ACTIVITÉ?

Une fois le matériel génétique total extrait, il faut séparer celui de chaque bactérie. Pour ce faire, les outils moléculaires permettent de récupérer seulement l'ADN (ou l'ADNc) d'intérêt : il suffit d'avoir les bons hameçons (amorces)! Et, heureusement, l'étude du génome entier d'une bactérie n'est pas nécessaire : on peut donc choisir

une amorce qui s'accroche à un seul gène retrouvé chez toutes les bactéries et amplifier le gène par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour faciliter sa manipulation. (Dans cette étude, le gène de ribosome ADNr 16S a été sélectionné.) Ensuite, la méthode des banques de clones permet de prendre toutes les copies du gène et de les séparer afin de déterminer quelle bactérie est présente et/ou active. Chaque clone obtenu est regroupé dans une banque et contient une seule copie du gène qui est séquencée afin d'identifier la bactérie correspondante (il suffit de comparer la séquence à celles disponibles dans les bases de données). C'est une méthode de quantification relative, car elle donne la proportion de chaque bactérie dans la banque, et non pas le nombre précis de chacune.

Les résultats de l'étude ont démontré que les lactocoques sont beaucoup plus présents au début de la maturation et qu'ils sont alors très actifs. Par contre, leur activité décline beaucoup plus vite que leur abondance : ils restent présents dans le fromage, mais ils ne semblent plus travailler... Pour les lactobacilles, la tendance est inverse : ils sont beaucoup plus actifs que ce que leur abondance laisserait supposer, et ce phénomène augmente en fonction du temps de maturation du cheddar. On peut donc affirmer que l'activité des lactobacilles est de plus en plus importante à mesure que le temps passe. Il y a aussi un effet du traitement thermique du lait sur la maturation : les bactéries des fromages fabriqués avec du lait thermisé restent beaucoup plus stables en abondance et en activité que celles des fromages fabriqués avec du lait pasteurisé.

LA GÉNÉALOGIE D'UN LACTOBACILLE

L. paracasei est déjà utilisé comme ferment d'appoint par l'industrie, mais il serait important de connaître les différents impacts technologiques entre les souches afin de les utiliser correctement. Le typage par le séquençage de plusieurs gènes a permis d'établir les liens entre 54 souches retrouvées dans des fromages commerciaux québécois et d'autres cheddars fabriqués à l'Université Laval en association avec le centre de recherche STELA (Sciences et technologie du lait). Cela a permis

de regrouper les souches en différentes familles : deux groupes avec un ancêtre commun (dont un regroupant des souches de trois sources différentes) et plusieurs souches indépendantes des autres. Cette classification pourrait être associée à leurs propriétés en fromagerie, ce qui permettrait de prédire l'effet de chaque souche sur la maturation.

COMMENT QUANTIFIER L'ACTIVITÉ?

Maintenant que la proportion de chaque bactérie a été déterminée par les banques de clones, il est possible d'aller quantifier précisément chaque espèce. En effet, l'identification obtenue par la banque nous permet de fabriquer des amorces encore plus spécifiques qui vont s'accrocher seulement à une espèce bactérienne (de lactocoques ou de lactobacilles) et de quantifier le nombre de copies du gène (nombre de bactéries) qui se retrouvent dans le fromage à un temps de maturation donné. Cette méthode est connue sous le nom de « PCR quantitative ».

Les résultats montrent encore une fois que la thermisation du lait a un effet stabilisant sur les bactéries par rapport à la pasteurisation. La température de maturation a également un effet : à 4°C, peu de lactobacilles sont actifs même s'ils sont détectés en abondance. À 7°C et 12°C, leur activité augmente considérablement, alors que celle des lactocoques diminue plus rapidement avec l'augmentation de température.

ET ENSUITE?

Tous les résultats ont permis de déterminer quelles bactéries de la flore secondaire sont actives pendant la maturation et à quel point. Maintenant, il faut déterminer quelles sont leurs actions précises pendant la maturation. C'est d'ailleurs la suite du projet. Une PCR quantitative à haut débit sera réalisée afin de quantifier l'expression de plusieurs gènes du métabolisme des bactéries (p. ex. : gènes qui contrôlent la formation des acides aminés responsables de la saveur) qui vont donner précisément l'action de chaque bactérie pendant l'affinage. Ces nouveaux outils seront accessibles aux industriels désireux de connaître la contribution des bactéries lactiques au cours de la maturation des fromages. ■