

La génomique en appui à la fabrication de fromage

Par **GISÈLE LAPOINTE**, professeur 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

■ Des travaux de recherche ont permis de décoder la « génétique » des ferments lactiques dans le but d'améliorer la qualité des fromages produits.

Faire du fromage cheddar demande au fromager de jouer à l'équilibriste! Le choix des ferments lactiques est un facteur déterminant. Ceux-ci, principalement constitués de bactéries appelées lactocoques (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*), ont la responsabilité de produire de l'acide à partir du lactose, le sucre présent dans le lait, pendant la production de fromage. Les ferments

jouent aussi un rôle essentiel au cours du processus de vieillissement du fromage pour le développement des saveurs caractéristiques du cheddar.

Les fabricants doivent, cependant, être attentifs à la prévention d'un risque: les lactocoques, comme tout organisme vivant, ont des parasites, des bactériophages, qui peuvent les affecter et même les détruire. L'attaque des bactériophages se constate par une fermentation perturbée du lait utilisé pour la fabrication du fromage. Il

existe toutefois une solution pour les fromagers. Elle consiste à faire une rotation des ferments, afin d'éviter les pertes occasionnées par une fermentation qui se déroule mal et le déclassement subséquent du fromage causé par une diminution plus rapide de la qualité organoleptique.

Comme pour un entraîneur, le fromager dispose des mélanges de souches de lactocoques, mais comme au hockey, les trios n'ont pas tous les mêmes aptitudes. Il en va de même pour les ferments fromagers, qui sont caractérisés par une grande variation conduisant à des propriétés technologiques différentes et, par conséquent, à une différence de performance et une qualité variable des fromages.

Pour la sélection des meilleures souches, il faut déterminer des tests capables de mieux prédire la performance des ferments, afin de faire les bonnes combinaisons de ceux-ci dans le but d'optimiser la qualité des fromages fabriqués. Ces tests peuvent maintenant s'effectuer sur la base de nouvelles approches moléculaires: la génomique, qui étudie le génome des bactéries constitué d'ADN (acide désoxyribonucléique), et la transcriptomique, qui étudie les messages (ARN messenger) transcrits à partir du génome lorsque les souches de lactocoques doivent s'adapter aux conditions retrouvées au cours de la fabrication du fromage cheddar.

Dans le cadre de la Chaire de recherche CRSNG – industrie laitière en technologie et typicité fromagère, Gisèle LaPointe, Ph. D., en collabora-

EN UN CLIN D'OEIL

CHAMP D'APPLICATION: Fabrication fromagère

OBJET DE LA RECHERCHE/ÉLÉMENTS D'INNOVATION: Mieux gérer la rotation et la combinaison des souches grâce à la généalogie des bactéries utilisées comme ferments.

RETOMBÉES POTENTIELLES: Améliorer la qualité du fromage et réduire les pertes de déclassement des fromages cheddar ayant développé des défauts durant la maturation.

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 D'AVANTAGE: Gisèle LaPointe: gisele.lapointe@fsaa.ulaval.ca et Denis Roy: denis.roy@inaf.ulaval.ca.



PHOTO : JOCELYN BOUTIN

tion avec Denis Roy, Ph. D., titulaire de la Chaire, ont encadré la candidate au doctorat, Amel Taïbi. Le but de sa thèse était de distinguer des souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et de prédire leurs performances au cours de la fabrication du fromage cheddar, grâce à la mise en application de trois outils moléculaires.

1. Une puce à ADN qui regroupe sur une plaque de verre un très grand nombre de gènes (1 030) sélectionnés par l'équipe à partir du génome connu d'un lactocoque témoin *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. Cette puce a permis de comparer les profils des gènes de huit souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, représentatives des souches utilisées dans la fabrication du fromage cheddar, avec celui de la souche témoin, tant à l'égard du génome qu'à celui du transcritome.
2. À la lumière des informations obtenues à l'aide de la puce à ADN, huit gènes différents ou marqueurs génétiques ont été sélectionnés pour déterminer la filiation de cinq souches de lactocoques.
3. Une méthode de quantification de l'expression des marqueurs gé-

tiques, la PCR quantitative, a aussi été utilisée pour connaître l'activité métabolique des souches à l'étude.

LA GÉNOMIQUE DES LACTOCOQUES

Un profil de type code à barres, obtenu à l'aide de la puce à ADN et permettant d'identifier le profil des gènes chez une nouvelle souche de lactocoques, s'avère utile pour estimer ses attributs. La souche peut posséder un caractère qui la rend inapte à faire du bon fromage. L'information acquise sur la similarité entre les gènes de cette souche et la souche témoin aide à prédire une déficience à éliminer ou à combler. En combinant cette souche avec d'autres souches possédant de meilleurs attributs, il est ainsi possible d'améliorer la qualité du fromage. La puce à ADN est un excellent outil pour la recherche ou pour des services diagnostiques, qui nous a fourni de l'information pour poursuivre la mise au point des deux autres outils basés sur la sélection de marqueurs génétiques.

LA GÉNÉALOGIE DES LACTOCOQUES

À la suite de l'analyse des résultats de type code à barres, des marqueurs gé-

tiques ont été choisis pour connaître le lien de parenté entre les souches. La séquence en nucléotides d'une portion de huit gènes a été analysée en détail afin de déterminer les différences qui peuvent exister entre les souches. Cette information a aidé à la construction d'arbres généalogiques pour retrouver la filiation de chacune des souches. On a été ainsi en mesure de regrouper les souches performantes ensemble. Une souche qui partage des caractéristiques génétiques avec une souche connue pour produire du bon fromage a plus de chance de se comporter de la même façon. Le fromager sera ainsi en mesure de composer différents mélanges de ferments plus appropriés. Une souche reconnue pour produire de l'amertume, défaut majeur d'un fromage, pourra être remplacée par une souche qui n'en produit pas, plus adaptée pour la production d'un fromage de qualité.

L'ACTIVITÉ DES LACTOCOQUES PENDANT LA FABRICATION DU FROMAGE CHEDDAR

La coagulation du lait est effectuée grâce à l'action concertée de la présure ajoutée au lait et de l'acide lactique produit par le métabolisme des lactocoques. À partir des protéines laitières,

des acides aminés sont libérés par la protéolyse (la dégradation des protéines en peptides) et la peptidolyse (la dégradation des peptides en acides aminés), effectuées par les lactocoques, et ensuite, par la flore secondaire, afin de produire des composants de saveur caractéristiques du fromage cheddar. La flore secondaire regroupe d'autres bactéries lactiques comme les lactobacilles qui se développent au cours du vieillissement du fromage (maturation). Pendant la maturation, l'éclatement (autolyse) des cellules bactériennes libère les enzymes dans la matrice fromagère pour continuer et même accélérer la production de la saveur. Même si le processus général est assez bien compris, les sources de variation entre les ferments conduisent parfois aux défauts organoleptiques causés par des activités inappropriées. Une meilleure compréhension de la source de ces variations permettrait de mieux sélectionner les combinaisons de souches de lactocoques donnant les meilleurs résultats.

Afin d'identifier le transcriptome ou réponse globale des souches de lactocoques au cours d'une simulation de la fabrication du fromage cheddar, l'étudiante au doctorat a extrait l'ARN (acide ribonucléique) des bactéries au cours des étapes clés : lors du chauffage et du salage du caillé fromager. À la suite de manipulations pour stabiliser cet ARN et incorporer une étiquette fluorescente, elle a hybridé les échantillons avec des puces à ADN et procédé à la lecture au laser des tâches fluorescentes sur la puce ainsi qu'à l'analyse des données recueillies par des logiciels spécialisés (bioinformatique), afin de déterminer la réponse transcriptomique. Cette approche a permis de comparer les profils d'expression des gènes pour établir les différences et les similitudes entre les réponses de quatre souches de lactocoques, lors de la montée de la température du lait de 32 °C à 38 °C (chauffage) et au moment du salage, par rapport à une condition de référence : le lait à une température de

32 °C. Sur les 1 030 gènes analysés, les quatre souches se distinguent par des différences d'expression de 34 gènes, dans les conditions initiales.

L'étape de chauffage permet au fromager de ralentir l'acidification du caillé tout en facilitant la précipitation des protéines. L'analyse transcriptomique a démontré que le métabolisme et la division cellulaire des souches sont effectivement ralentis par l'étape de chauffage. Cependant, les données d'expression des gènes montrent que toutes les souches sont plus affectées par l'addition du sel que par l'étape de chauffage, celle-ci correspondant à un stress qui induit l'expression de gènes pour le surmonter. La souche de référence (SK11) se distinguait des autres souches, après le chauffage, par l'activation des systèmes de transformation des protéines lactières en acides aminés. Ceci pourrait être un bon indicateur d'une souche qui ne produit pas d'amertume, parce que l'activation de ces systèmes permettrait entre autres d'éviter l'accumulation de peptides amers dans



la matrice fromagère et fournirait des substrats à la flore secondaire pour la production de composés de saveur. À la suite du salage, les lactocoques expriment des gènes qui sont responsables d'une plus grande lyse de cellules. Cette activité autolytique libère des enzymes capables de dégrader plus de protéines et de peptides en acides aminés dans la matrice fromagère pour accélérer la maturation du fromage cheddar.

Cette première analyse comparative des transcriptomes (l'ensemble des ARN messagers qui sont utilisés par les cellules comme matrice pour la synthèse des protéines) des souches de lactocoques de type « *cremoris* » nous a permis de mieux comprendre les réponses métaboliques au cours de la fabrication fromagère, d'identifier un transcriptome commun qui pourrait représenter la partie de la réponse qui est identique parmi tous les ferments lactiques au cours de la fabrication et, par conséquent, d'identifier des

réponses spécifiques permettant de distinguer les souches. Ces dernières réponses permettent d'identifier des marqueurs technologiques comme des gènes de la réponse au stress ou reliés à la production de saveurs qui pourront être utilisés en industrie pour préparer des combinaisons de ferments performants.

L'outil des puces à ADN est idéal pour un laboratoire de recherche, car il permet de dégager des gènes spécifiques pouvant servir à une surveillance plus ciblée d'activités clés pour la réussite du processus d'affinage par une meilleure combinaison des souches. La PCR quantitative est une méthode moléculaire, transférable en industrie, permettant d'analyser l'expression des marqueurs génétiques sélectionnés dans ce projet, dans le but de classer des souches de lactocoques selon leur réaction au stress, leur niveau de réduction de l'amertume et le début de la transformation des acides aminés en composés de saveur.

PRÉDIRE LE DÉROULEMENT DE L'AFFINAGE

L'approche de profilage génomique permet de prédire des défauts dans les souches utilisées comme ferment. Celle du profilage des activités métaboliques basée sur l'expression des gènes permet de combiner des souches compatibles et complémentaires. En comprenant mieux la succession des activités métaboliques associées à la production d'un fromage d'excellente qualité, on offre au fromager des outils de sélection des ferments à ses leviers sur le contrôle du procédé. La perspective issue de la Chaire de recherche CRSNG – industrie laitière en technologie et typicité fromagère est d'étendre ce type d'analyse à la flore secondaire (lactobacilles dominants qui se développent au cours de la maturation) pour obtenir une vision globale de l'activité de la communauté microbienne dans le fromage cheddar. ■

