

Résumé du projet

De plus en plus, les producteurs canadiens de fromages performant au niveau mondial en produisant une grande diversité de fromages ayant une typicité qui leur appartient. Toutefois, la grande demande et cette diversité de produits compliquent la tâche des fromagers qui se doivent de conserver une qualité constante. Le premier objectif de la Chaire est de favoriser une compréhension du rôle de la minéralisation et de la déminéralisation sur la texture des fromages tandis que le deuxième est de déterminer la relation qui existe entre la typicité et la saveur des fromages et la succession des flores, l'induction et l'expression de gènes à l'échelle génomique de cet écosystème microbien complexe. Dans l'objectif 1 l'analyse globale de plusieurs paramètres (composition, rhéologie, interactions chimiques, par exemple) lors de l'affinage de trois types de fromages, permettra d'obtenir un profil typologique de chaque fromage à l'étude, afin de mieux comprendre les relations directes entre la composition du fromage et ses propriétés finales. L'attente de l'objectif 2 permettra d'évaluer la diversité des communautés microbiennes du fromage, de procéder à l'identification des espèces présentes et d'en comparer l'abondance. À terme, ces travaux, auront généré une analyse poussée de l'évolution des diverses espèces présentes dans les fromages lors de la maturation. Ces informations seront utiles pour améliorer la saveur et la qualité des fromages par une compréhension des changements de la communauté microbienne au cours de la maturation des fromages Cheddar et Camembert.

Objectifs et méthodologie

Objectif 1 : Un profil de typicité globale (composition, minéralisation, protéolyse) a été établi pour trois fromages de minéralisation différente, soit la Mozzarella, le Cheddar et l'Emmental. L'influence de cette minéralisation sur les propriétés rhéologiques et de fonte a aussi été étudiée. Pour le Cheddar, l'impact du ratio sel/humidité (S/H) (3,50 à 5,25) et l'impact du traitement thermique du lait (pasteurisation vs thermisation) sur les propriétés rhéologiques (texture, sensorielle, protéolyse) ont été mis à l'étude. Les résultats sur la composition de ces fromages seront corrélés avec le volet moléculaire (objectif 2), ce qui permettra d'observer l'impact des paramètres sur la cinétique des populations microbiennes. Un projet a été mis sur pied pour déterminer les conditions de fabrication et d'affinage idéales pour produire une Mozzarella faible en sel. Le pourcentage de sel, la substitution du NaCl, le choix des souches, la séquence de salaison et les conditions de fabrication seront déterminés. La protéolyse, les propriétés fonctionnelles, la texture et l'évaluation sensorielle seront aussi comparés dans le but d'obtenir un fromage similaire à un fromage standard.

Objectif 2 : Déterminer la structure phylogénétique de la communauté microbienne présente dans des fromages Cheddar et Camembert à divers stades de maturation par des techniques moléculaires : la PCR quantitative (qPCR) (Cheddar et Camembert), les banques de clones

basés sur l'ADNr 16s ou l'ARNr 16S (Cheddar), l'Automated ribosomal intergenic spacer analysis ou ARISA (Camembert) et la Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism ou T-RFLP (Cheddar et Camembert). Pour faire le suivi des communautés actives, des méthodes d'extraction de l'ARN ont été comparées et utilisées en Reverse Transcriptase PCR quantitative ou RT-qPCR (Camembert et Cheddar). Une puce à ADN spécifique à *L. lactis* ssp. *cremoris* a été conçue pour déterminer la différence d'expression de plus de 1000 gènes entre cinq souches de lactocoques après chauffage et salage du caillé. À l'aide des informations fournies par la puce, une technique de typage appelée Multilocus sequence analysis ou MLSA a aussi été appliquée. Afin de déterminer l'activité métabolique individuelle de deux souches de *L. lactis* ssp. *cremoris* en coculture et de pouvoir déterminer leur dominance relative. Les gènes identifiés par hybridation suppressive et soustractive (SSH) ont été utilisés pour la quantification par RT-qPCR. Une banque d'ADNc a été développée afin de déterminer les gènes exprimés par la flore du Camembert afin de mieux comprendre les diverses voies métaboliques. Le niveau d'apoptose ou mort cellulaire sera évalué en cours d'affinage du Camembert par des méthodes enzymatiques tels que la coloration DAPI et la méthode TUNEL ainsi qu'une méthode moléculaire basée sur la technique CodeHop pour la conception d'amorces de RT-qPCR.

Résultats et applications

A) Nouvelles connaissances : Un profil de typicité globale (composition, minéralisation, protéolyse) a été établi pour quatre fromages de minéralisation différente, soit la Mozzarella, le Cheddar, le Camembert et l'Emmental. La teneur en calcium soluble après 15 jours d'affinage est en relation directe avec le taux de minéralisation du fromage ainsi qu'avec la capacité tampon. Des méthodes moléculaires (T-RFLP et ARISA) ont permis la détection des principaux genres fongiques détectés dans les fromages de type Camembert : *Geotrichum*,

Penicillium, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* et *Pichia*. Grâce à cette approche de profilage, il est possible de différencier les flores fongiques en surface et dans la croûte des fromages de type Camembert et Brie, de déterminer l'impact de la taille et du procédé de fabrication (traditionnel ou stabilisé) sur le développement des flores et, de détecter la présence de contaminants fongiques au cours de la maturation.

Résultats et applications - suite...

L'approche métagénomique a permis d'améliorer la compréhension de l'activité des mycètes contenus dans la croûte de Camembert en déterminant les gènes exprimés par la flore fongique d'un fromage Camembert prêt à la consommation. Le développement d'une puce à ADN spécifique à *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a permis d'identifier des marqueurs d'activité. Environ 90 % des gènes de la souche SK11 sont communs à 5 autres souches de *L. lactis* ssp. *cremoris*. Les gènes variables entre les souches codent pour des fonctions de métabolisme, de biosynthèse des acides aminés, d'osmorégulation et de la protéolyse. Les gènes dont l'expression varie après chauffage chez toutes les souches, sont impliqués dans le métabolisme, la réaction au stress, la régulation de la transcription et traduction et enfin dans la division cellulaire. La méthode de criblage différentiel SSH a permis découvrir des gènes spécifiques de deux souches de lactocoques sans connaissance préalable du génome de l'une d'entre elles. L'activité individuelle de chaque souche en coculture a été mesurée par RT-qPCR.

B) Applications : 1. Mise au point d'une méthode d'analyse des protéines dans le fromage par BioAnalyzer en remplacement du SDS-Page. 2. Développement d'une méthode permettant de connaître les gènes exprimés par la flore fongique d'un fromage Camembert prêt à la consommation. 3. Mise au point d'une approche de quantification par PCR en temps réel permettant le suivi d'une population fongique mixte composée de *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* et *Kluyveromyces lactis* sur un caillé modèle de type Camembert. 4. Optimisation de la méthode SIGEX pour le métagénome des bactéries de la flore secondaire (NSLAB) du fromage Cheddar. 5. Développement d'une méthode permettant de mesurer des réponses métaboliques des souches de lactocoques en co-culture durant la fabrication fromagère. 6. Application d'une méthode d'extraction d'ARN utilisant une lyse mécanique faite par les billes qui donne un ARN de meilleure qualité. 7. Développement d'une puce à ADN spécifique à *L. lactis* ssp. *cremoris* qui a permis d'identifier des marqueurs d'activité utile pour le suivi des lactocoques pendant la production fromagère. 8. Analyse détaillée de la relation entre la variation du rapport S/H, la protéolyse, la texture et le développement de la flore bactérienne.

Transfert des résultats

Des affiches et une communication orale ont été présentées lors du Colloque STELA (Mai 2009 à Québec) ainsi que deux affiches et une présentation orale au Colloque du Club des bactéries lactiques (Mai 2009, Toulouse, France). Deux articles ont été publiés. Cinq étudiantes de 2^{ème} cycle (V. Albert, M. Arteau, K. Valverdu-Spitz, E. Thibaudeau, R. Labonté), quatre étudiantes au 3^{ème} cycle (A. Taïbi,

S. Rachek, E. Desfossés-Foucault, M.-H. Lessard), un stagiaire post-doctoral (B. Ndoye) et deux professionnelles de recherche (C. Viel et P. Savard) ont contribué au projet et seront formés pour assurer la relève en industrie fromagère.

Partenaires financiers

Agropur coopérative
Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
Damafro inc.
Fromagerie Clément inc.
Groupe Saputo inc.
Les producteurs laitiers du Canada
Parmalat Canada
Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 2 125 000 \$

Point de contact

Responsable du projet :

Denis Roy

Université Laval

Centre de recherche en sciences

et technologie du lait (STELA)

2425, rue de l'agriculture, Québec (Québec) G0V 1A6

Téléphone : (418) 656-2131 poste 3098

Télécopieur : (418) 656-3353

Courriel : Denis.roy@inaf.ulaval.ca

Collaborateurs :

Steve Labrie, Gisèle LaPointe, Sylvie Turgeon, Université Laval

Daniel St-Gelais, Agriculture et Agroalimentaire Canada (CRDA)



2750, rue Einstein, bureau 220-A, Québec (Québec) G1P 4R1
Tél. : (418) 527-7947 • Téléc. : (419) 527-5957
novalait@novalait.ca • www.novalait.ca