

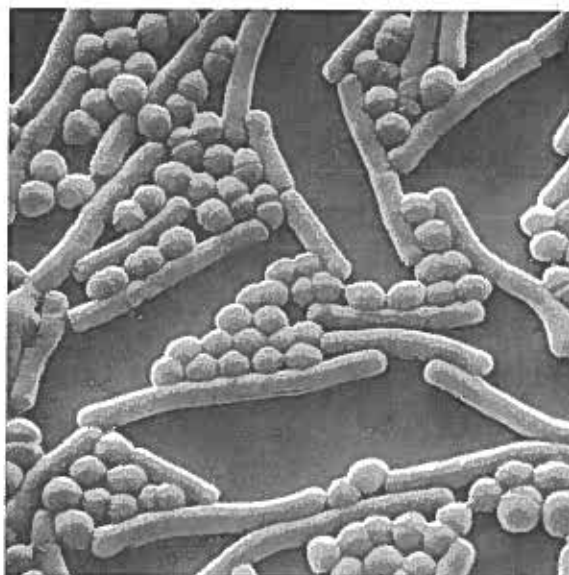


Octobre 1987/163 P

Station de recherches laitières
CH-3097 Liebefeld

Biotechnologie et industrie laitière

Martin Fürst et Robert Sieber



1ère partie: publication du LAITIER ROMAND 113 (37), p. 2 (1987)
2ème partie: publication du LAITIER ROMAND 113 (42), p. 2 (1987)
3ème partie: publication du LAITIER ROMAND 113 (43), p. 1 (1987)

Culture mixte brute de Lactobacillus lactis et
de Streptococcus thermophilus.

Microscopie électronique (M. Rüegg et U. Moor)

Grossissement: 4220

I.Éléments fondamentaux de la biotechnologie

La biotechnologie est définie comme étant la meilleure utilisation technique des propriétés de la cellule vivante par l'intermédiaire de la biochimie, de la microbiologie et de l'ingénierie. Le génie génétique prend de plus en plus d'importance et s'étend aussi à l'industrie laitière.

La biotechnologie n'est pas une technologie nouvelle. On l'utilisait dans l'antiquité déjà pour faire de la bière, du pain, du vin et du fromage. Les bactéries lactiques étaient actives sans que l'on connût les processus de fermentation spontanés. La production de ces aliments s'appuyait non pas sur des bases scientifiques, mais sur des connaissances empiriques.

Il y a plus de 100 ans, lorsque les fromageries se sont aussi installées en plaine, on a commencé à employer des cultures de bactéries lactiques. Les premières provenaient du petit-lait; plus tard on a essayé de mettre au point des cultures sélectionnées, ce qui a permis par la suite de fabriquer des produits laitiers de première qualité. De grands efforts ont été entrepris pour adapter les cultures aux besoins, et on continue de les améliorer. On n'a pourtant pas encore réussi à éviter les perturbations d'acidification, provoquées par des incidents d'ordre technique, biologique ou hygiénique; ceux-ci se produisent périodiquement et ne peuvent pas être éliminés par des mesures traditionnelles.

Après les trois phases de la biotechnologie classique (tableau 1), la biotechnologie nouvelle a pu se développer au cours des 10 à 15 dernières années, grâce aux progrès réalisés dans la biologie moléculaire, le génie génétique, la production de cultures et de cellules, les recherches enzymatiques et notamment les techniques des procédés, des mesures, des réglages et l'évaluation par ordinateur. Dans l'industrie pharmaceutique, cette évolution a déjà conduit à d'importantes nouveautés. Dernièrement, pour les bactéries lactiques, des instituts étrangers ont aussi obtenu des résultats prometteurs en laboratoire. Pour pouvoir appliquer utilement cette nouvelle technologie dans l'industrie laitière, il faut toutefois posséder des connaissances approfondies sur l'information génétique et le métabolisme des bactéries lactiques utilisées.

Tableau 1: Stades de développement de la biotechnologie

1. Fabrication biotechnologique traditionnelle de denrées alimentaires et de fourrages tels que les produits laitiers fermentés, le fromage, le pain, la bière, le vin

2. Procédés biotechnologiques à l'aide de microorganismes dans des conditions non stériles pour la fabrication de levain, de levures alimentaires et fourragères, d'éthanol, d'acide lactique, d'acide acétique etc.

3. Procédés biotechnologiques dans des conditions stériles pour la fabrication d'antibiotiques, de vitamines, d'acides aminés etc.

4. Nouvelle biotechnologie, issue de l'application de connaissances et de méthodes scientifiques avancées dans les domaines de
 - la biologie moléculaire, notamment le génie génétique

 - la production de cellules

 - la technologie des enzymes (utilisation d'enzymes immobilisées sur un support)

 - la technologie des bioréacteurs

Source : REHM, H.J.: Industrielle Mikrobiologie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980)

Dans toute cellule vivante, les chromosomes portent les informations nécessaires aux fonctions vitales. On appelle gène l'élément d'un chromosome qui constitue une unité de fonction. Dans toute cellule vivant dans des conditions naturelles, les chromosomes sont toujours en cours de réorganisation. Les gènes peuvent changer subitement par mutation. Des éléments chromosomiques extérieurs peuvent s'incorporer à la cellule, d'autres peuvent s'en séparer : ces changements contribuent à la transformation lente et progressive des organismes, appelée l'évolution. Selon les conditions ambiantes et les transformations génétiques subies, les cellules viables se multiplient en engendrant une descendance aux propriétés diverses. Or, le génie génétique essaie d'accélérer ces processus naturels et fortuits et de les utiliser systématiquement pour produire les propriétés souhaitées. On appelle ces travaux de laboratoire "manipulations génétiques" ou "génie génétique".

Dans les bactéries lactiques, un chromosome sous la forme d'un anneau fermé porte les informations nécessaires à toutes les fonctions vitales et à la production de 3'000 enzymes différentes au maximum. Ces cellules peuvent aussi contenir des plasmides, chromosomes de petite taille, ne comportant que peu de gènes (fig. 1). Les plasmides des streptocoques mésophiles, par exemple, sont porteurs d'informations essentielles pour la fermentation du lait, la dégradation du lactose et la protéolyse. D'après les connaissances actuelles, ces plasmides ne sont pas indispensables à la vie de la cellule et parfois ils se perdent pour des causes inconnues. Cette perte d'informations essentielles pour la transformation du lait est à l'origine de l'instabilité des cultures. Nous ne savons pas encore si les bactéries lactiques thermophiles utilisées le plus souvent en Suisse subissent les mêmes transformations génétiques, ce qui expliquerait leur instabilité fréquente. Les éléments extrachromosomiques tels que les plasmides ou les chromosomes des bactériophages se sont révélés très importants comme instruments du génie génétique. Ils se multiplient dans des cellules vivantes, où on peut les isoler facilement sans les endommager. Ces propriétés permettent à la biologie moléculaire de les utiliser comme transporteurs pour introduire des gènes "étrangers" dans une cellule: cette technique consiste à couper les plasmides en un seul endroit à l'aide d'une enzyme naturelle appropriée et à y introduire les gènes souhaités. De tels plasmides "manipulés" peuvent être réincorporés dans les bactéries d'origine ou transférés dans de nouvelles bactéries, où ils se multiplient et où ils peuvent exprimer la nouvelle information qu'ils portent (fig. 2).

Cette technique génétique, représentée ici de façon simplifiée, est en réalité un procédé de manipulations très compliquées, dont toutes les conditions n'ont pas encore été établies, notamment celles qui concernent les bactéries lactiques thermophiles si importantes pour nous.

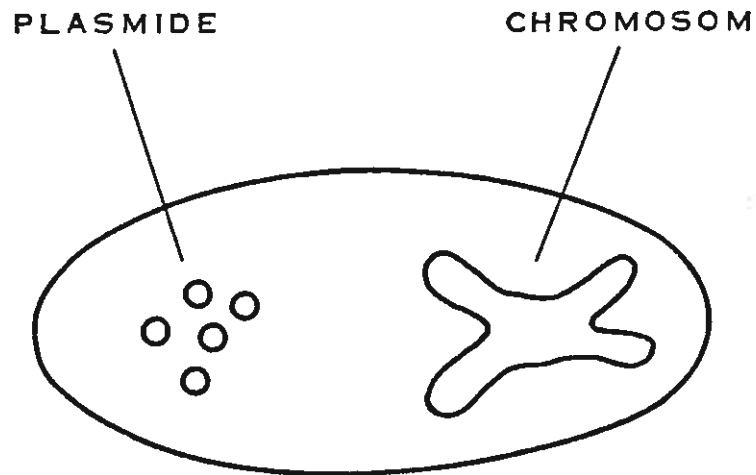


Figure 1: Bactérie avec chromosome et plasmides. Les plasmides pouvant se multiplier indépendamment du chromosome de la bactérie, celle-ci en possède presque toujours plusieurs.

Transfert d'un gène de protéase d'un streptocoque sur un lactobacille

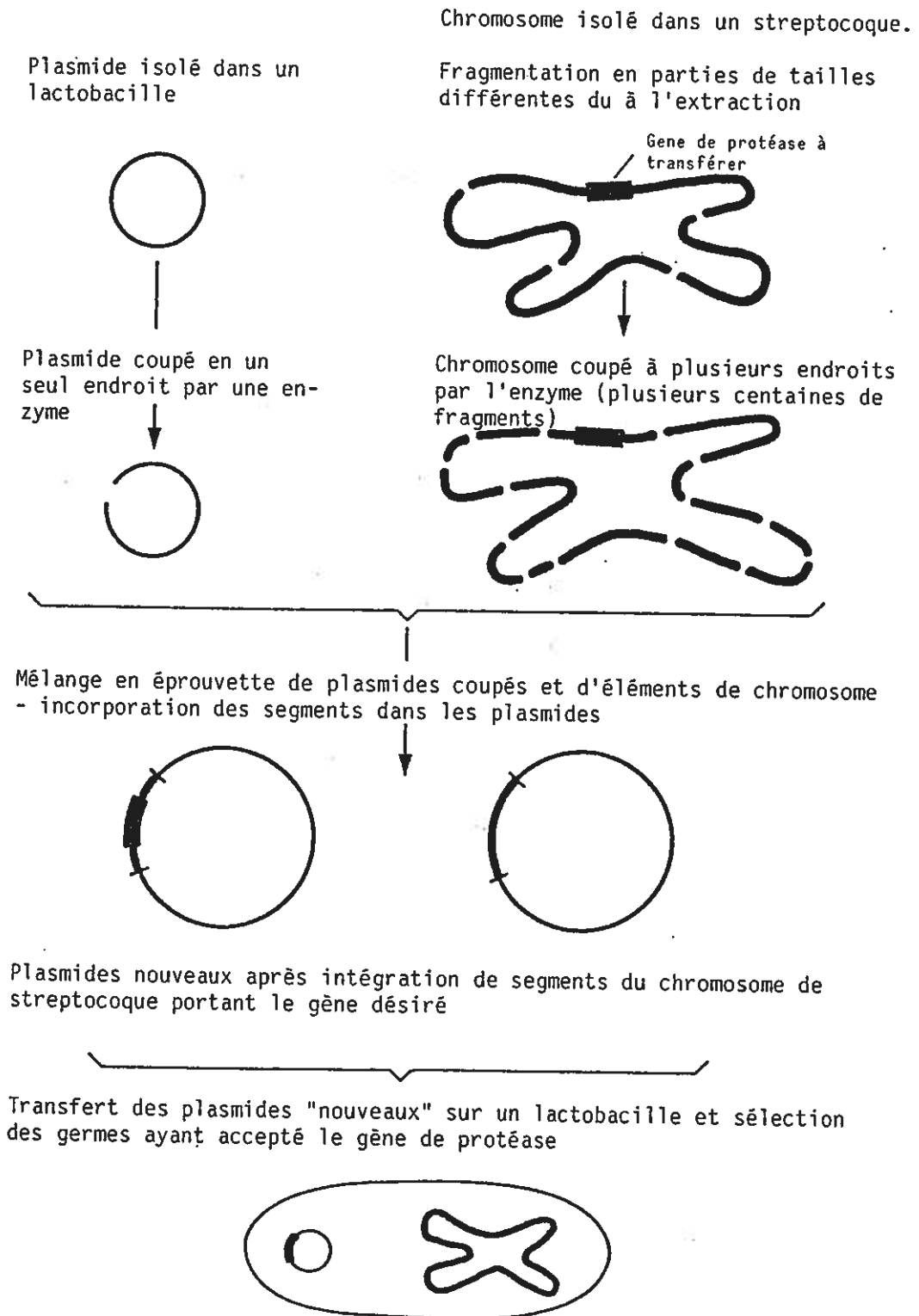


Figure 2: Représentation schématique d'une manipulation génétique théorique de bactéries lactiques: transfert d'un gène de protéase d'un streptocoque sur un lactobacille

Quelques définitions

Biotechnologie	utilisation des propriétés de la cellule vivante par les sciences naturelles et l'ingénierie
Génie génétique	branche de la biotechnologie qui groupe les techniques de recombinaison artificielle pour l'obtention de matériel génétique nouveau
Biologie moléculaire	science consacrée à l'étude du fonctionnement des êtres vivants à l'échelle moléculaire
Cultures cellulaires	production de cellules dans des milieux artificiels
Technologie des bioréacteurs	technique de production de cellules à l'échelle industrielle, en fermenteurs, dans des conditions contrôlées
Chromosome	molécule filiforme d'acide nucléique portant les facteurs déterminant l'hérédité d'une cellule
Gène	élément de chromosome gouvernant, le plus souvent, la production d'une protéine spécifique
Plasmide	élément extrachromosomique facultatif, de petite taille, porteur d'un nombre restreint de gènes
Transporteur	plasmide ou chromosome de bactériophage dans lequel on a incorporé des gènes étrangers, qui peuvent être ainsi transférés dans des cellules hôtes
Criblage	procédé de sélection selon des propriétés définies
Exprimer	traduire l'information portée par un gène en termes de synthèses cellulaires
Enzymes immobilisées	enzymes fixées sur un support pour une utilisation localisée

II. Recherches actuelles

Le génie génétique et la technologie des enzymes sont deux branches de la nouvelle biotechnologie qui retiennent l'attention. Dans les deux domaines, les recherches se sont intensifiées et ont abouti aux premiers résultats prometteurs, dont plusieurs intéressent aussi l'industrie laitière.

Champ d'application du génie génétique

C'est dans l'industrie pharmaceutique que le génie génétique a remporté les plus grands succès. Grâce à l'utilisation des méthodes génétiques les plus modernes, il est possible de fabriquer aujourd'hui à l'échelle industrielle des produits tels que l'insuline (pour le traitement du diabète), l'interféron (pour la lutte contre les virus et le cancer), des hormones de croissance humaines et animales (pour l'augmentation de la production de lait, par exemple).

Dans l'industrie laitière, les recherches génétiques ont débuté plus tard. Au cours des dernières années, elle a cependant commencé à s'intéresser davantage à cette technologie éprouvée en pharmacologie. Ainsi, en 1972, année de la découverte de plasmides dans les streptocoques lactiques par l'Américain McKay, le nombre de laboratoires se consacrant à la génétique des bactéries lactiques augmentait de 5 à 50 dans le monde entier. En outre, la Commission de la CEE a son propre programme de recherches pour le développement des techniques de biologie moléculaire, auquel collaborent des groupes de travail du domaine laitier à Kiel (RFA), à Cork (Irlande), à Reading (Angleterre), à Groningen et à Ede (Hollande). Leurs études ont pour but de fabriquer avec moins de travail des produits laitiers plus sûrs, de même ou de meilleure qualité ainsi que de nouveaux produits et d'encourager ainsi la promotion des ventes.

Cultures de bactéries lactiques pour la fabrication de fromage: On constate souvent l'instabilité des bactéries lactiques: la perte de certaines de leurs propriétés provoque des perturbations au cours de la fermentation. L'utilisation de bactéries lactiques implique donc des risques. La formation de faux-goûts dans le produit fini et la sensibilité des bactéries aux phages sont d'autres défauts qui limitent le nombre de cultures disponibles. Les producteurs de cultures sont ainsi obligés de renouveler sans cesse la gamme de souches et de les modifier. Jusqu'à présent il a fallu de vastes programmes de criblage pour isoler et sélec-

tionner de nouvelles souches utilisables. La biotechnologie moderne offre d'autres possibilités pour mettre au point des souches "faites sur mesure", aux propriétés génétiquement stables et programmées. Pour les streptocoques mésophiles, on espère que d'ici à 1990/1995 les bases scientifiques seront suffisamment développées pour pouvoir produire des souches génétiquement modifiées qu'on peut utiliser en pratique. Les travaux pour le contrôle du métabolisme du lactose sont déjà très avancés; ils permettront de diriger l'acidification. Egalement à l'étude sont le métabolisme du citrate et les activités de la protéinase et de la peptidase dont dépendent la durée de maturation et la formation du goût. Cependant, malgré les innombrables publications scientifiques, on dispose de très peu d'informations sur l'emploi prochain de cultures "manipulées", et l'on se demande si des renseignements essentiels sont retenus pour des raisons commerciales.

Contrairement au niveau de recherches sur les bactéries lactiques mésophiles, les études génétiques sur les thermophiles et les bactéries propioniques sont en retard. Cela s'explique par le fait que ces germes sont peu utilisés à l'étranger. La Station fédérale de recherches laitières (FAM) a constitué un groupe de travail qui étudie les problèmes génétiques en rapport avec la labilité du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques employées chez nous. Ces travaux visent à mettre au point les techniques nécessaires à l'application en pratique du génie génétique.

L'infection des cultures par des bactériophages est un autre problème qu'on essaie de résoudre à l'aide du génie génétique: il s'agit d'incorporer au chromosome de streptocoques appropriés des gènes stables résistant aux phages. D'autres travaux génétiques ont pour but la production de substances antibactériennes (nisine et autres bactériocines) pour la conservation naturelle de denrées alimentaires.

Production de présure: Différentes équipes de chercheurs ont réussi dernièrement, indépendamment les unes des autres, à isoler, des cellules de caillettes de veaux, les gènes nécessaires à la synthèse de la présure. Ceux-ci sont incorporés aux chromosomes de bactéries et de levures couramment utilisées dans l'industrie alimentaire et qui ne présentent donc aucun risque. Placés dans des fermenteurs, les microorganismes ainsi modifiés sont capables de produire les quantités souhaitées de présure pure. Les premiers essais pratiques à grande échelle pourront être effectués dès que la sécurité biologique de ces produits sera testée. Ils pourront probablement être sous peu utilisés en pratique.

Technologie des enzymes

Cette autre branche de la biotechnologie se propose d'assurer l'application directe d'enzymes dans la transformation du lait. Il est impensable de fabriquer aujourd'hui des produits laitiers fermentés ou du fromage sans l'emploi systématique de microorganismes. En réalité, ce sont cependant les enzymes qui provoquent les transformations chimiques. A l'aide d'enzymes produites par génie génétique, on essaie de diriger les processus biochimiques se déroulant lors de la fabrication de denrées alimentaires. On étudie les enzymes pour influencer la formation des arômes, pour éliminer le goût de cuisson du lait UHT ou pour éviter l'oxydation de la matière grasse ou encore pour connaître leur activité antibactérienne. De telles enzymes sont utilisées, sous forme libre ou immobilisée, pour la fabrication de boissons, de fromages, de produits de poudre de lait, de produits laitiers fermentés ainsi que pour la mise en valeur du petit-lait.

Hydrolyse du lactose du lait: Si les travaux génétiques sur les cultures sont encore au stade expérimental, la technologie des enzymes a déjà remporté les premiers succès pratiques. L'emploi de la β -galactosidase pour la fabrication de lait et de produits laitiers pauvres en lactose et pour la mise en valeur du petit-lait a suscité beaucoup d'intérêt dans le monde entier.

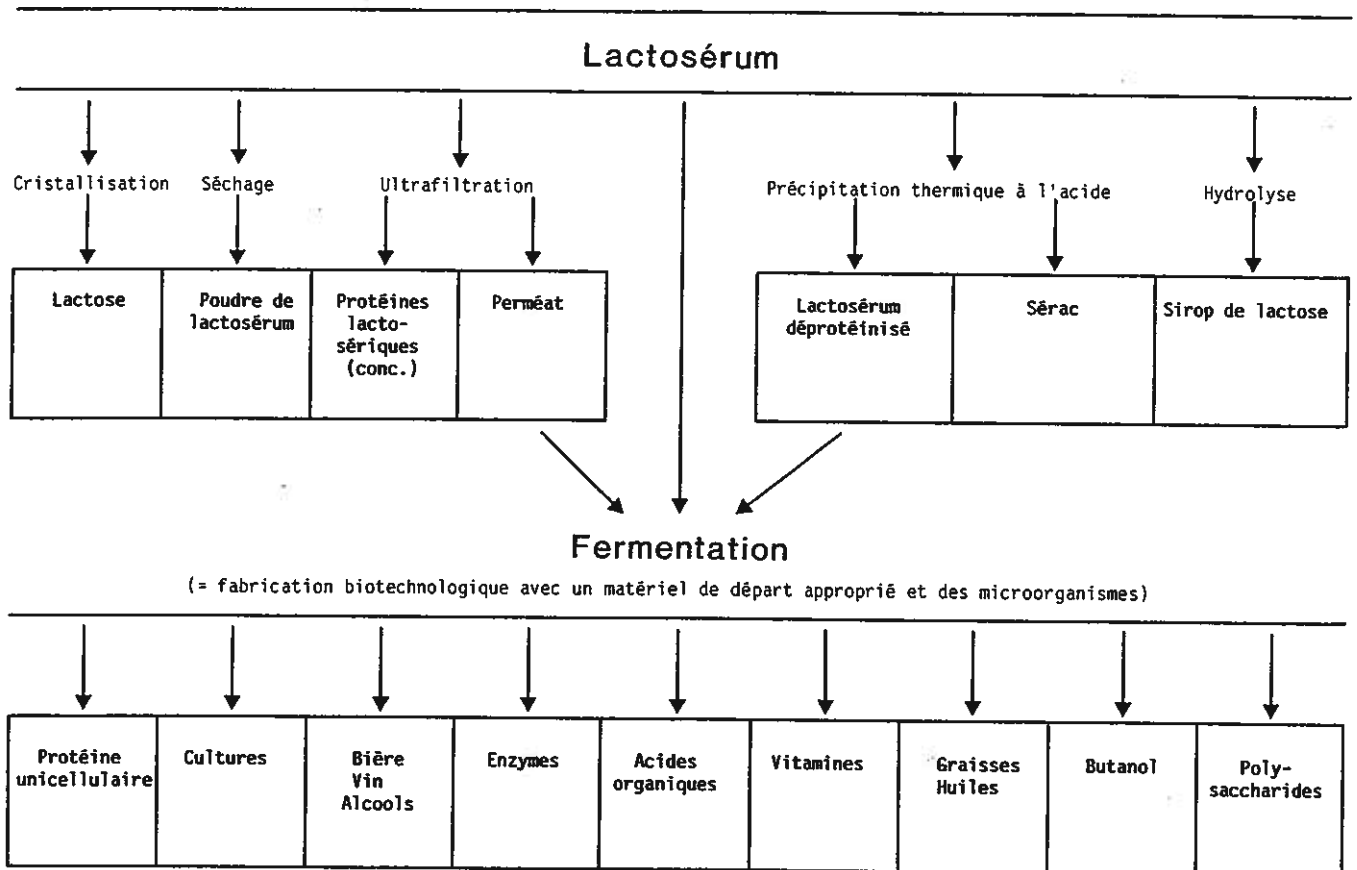
Accélération de la maturation du fromage: La durée d'entreposage du fromage est un facteur économique important. De vastes recherches, à l'échelle mondiale, sont destinées à étudier les possibilités d'accélérer la maturation du fromage. On dispose aujourd'hui de plusieurs méthodes, dont chacune a ses avantages et ses inconvénients (tableau 1). L'essentiel est de connaître à fond l'action et les caractéristiques des enzymes qui président à la formation des arômes afin d'éviter toute altération de la qualité du produit fini. La complexité des rapports entre les différents phénomènes ne permet pas encore l'application à grande l'échelle de cette technologie.

Mise en valeur du lactosérum: Les efforts entrepris pour augmenter l'utilisation du petit-lait dans l'industrie alimentaire ont mené à la mise au point d'innombrables produits. Un des procédés utilisés est la fermentation du lactosérum (figure 1).

Tableau 1: Méthodes d'accélération de la maturation du fromage

Méthode	Avantages	Inconvénients
1. Augmentation de la température	application simple	effets non spécifiques; risques accrus de contamination microbienne
2. Adjonction d'enzymes	frais modiques effet spécifique	choix limité d'enzymes appropriées; risque de maturation trop intense; application difficile
a) directement au lait	bonne homogénéisation	forte contamination du lactosérum; mauvais rendement
b) sous forme de capsule	méthode de choix	
c) au caillé	texture et rendement normaux	mauvaise homogénéisation
3. Cultures génétiquement modifiées naturel;	maintien de l'équilibre enzymatique application simple	difficultés techniques; actuellement encore peu rentable
4. Adjonction de lactosérum préincubé	formation d'arômes rapide	grand risque de contamination microbienne; traitement indispensable du produit fini

Figure 1: Transformation biotechnologique du lactosérum



III. Un des domaines les plus innovateurs

C'est à juste titre qu'on considère la nouvelle biotechnologie, en particulier le génie génétique, comme un des domaines les plus innovateurs. Ses applications poseront sans doute d'importants problèmes à l'industrie laitière. Même si certaines possibilités semblent utopiques, les résultats obtenus indiquent que de nombreux projets seront réalisés dans les années ou décennies à venir.

Pour évaluer les chances de la nouvelle biotechnologie dans l'industrie laitière, il faut tenir compte, en plus des problèmes scientifiques et techniques, d'aspects économiques, écologiques, politiques, juridiques et même éthiques. Cependant, même en examinant tous ces facteurs, il est difficile de circonscrire les futures applications pratiques, car chaque nouveau résultat entraîne d'autres possibilités. On s'attend à ce que l'écoulement de produits fabriqués par génie génétique augmente sensiblement le taux de croissance sur le marché mondial (tableau 1). La complexité grandissante des problèmes biotechnologiques obligera les domaines de recherche les plus divers à une collaboration encore plus étroite.

Tableau 1: Valeur marchande estimée de produits fabriqués par génie génétique à l'échelle mondiale (en millions de dollars)

Secteur	1980	1982	1985	1990	2000
Santé	2	115	1'400	17'000	43'000
Chimie			250	1'200	8'200
Fourrages et denrées alimentaires		5	1'250	4'900	11'000
Agriculture			500	1'900	5'300
Energie			350	10'000	75'000
Autres			5	120	2'050
Total	2	120	3'755	35'120	144'550

Source: Biotechnology News (1982); cité d'après F. Hülsenmeyer: Erwartungen der Ernährungswissenschaft von der Biotechnologie, dans E. Scheiber: Zukunftschance Biotechnologie, Oesterreichische Gesellschaft für Land- und Forstwirtschaft (1985)

Face aux problèmes économiques croissants, l'industrie laitière sera contrainte à se servir davantage de la nouvelle biotechnologie. Les recherches en cours se concentrent sur les streptocoques mésophiles et seront sans doute renforcées. Pour nous, il est nécessaire de poursuivre les travaux sur les streptocoques thermophiles, les lactobacilles et les bactéries propioniques afin d'être compétitifs sur le marché international (tableau 2).

Tableau 2: Cultures bactériennes - Objectifs à court terme du génie génétique

1. Production de cultures à une et à plusieurs souches génétiquement "manipulées", aux propriétés définies telles que

- . résistance aux phages génétiquement stable
- . formation dirigée d'arômes de produits laitiers
- . accélération de la maturation de fromages
- . pouvoir acidifiant stable

2. Création de nouveaux produits laitiers

D'après les connaissances actuelles, les cultures bactériennes utilisées dans l'industrie alimentaire sont inoffensives pour la santé de l'homme et des animaux ainsi que pour l'environnement. Pour maintenir ce niveau de sécurité, il est indispensable que tous les éléments génétiques transférés par manipulation proviennent de cellules ou de microorganismes dont l'utilisation dans l'industrie alimentaire est autorisée ou qui se sont avérés inoffensifs à tous égards. Les gènes conférant la résistance aux antibiotiques doivent être exclus. Même si ces mesures de précaution sont observées, chaque nouvelle souche reconstruite doit être soigneusement contrôlée quant à son innocuité (test de pathogénie) avant d'être utilisée en pratique.

En particulier, les produits agricoles fabriqués par des procédés génétiques doivent être soumis à des examens minutieux avant leur approbation et enregistrement. Aussi le Conseil fédéral a-t-il créé un service de coordination interdisciplinaire qui conseille les requérants et les autorités en cas de conflit de compétences ou d'incertitude en ce qui concerne la procédure d'approbation. Il est assisté par la Commission suisse pour la sécurité biologique, qui a des fonctions consultatives et d'expertises.

Elle examine dans chaque cas particulier quels essais de contrôle doivent être effectués avant l'expérimentation à grande échelle ou la commercialisation. Elle apprécie les risques qui pourraient subsister et recommande au service d'approbation les prescriptions et instructions qui doivent accompagner les produits commercialisés.

A l'avenir, l'industrie laitière pourra disposer non seulement de microorganismes génétiquement adaptés, mais aussi d'un grand nombre d'enzymes fabriquées à des prix modiques. L'hydrolyse du lactose à l'aide de la β -galactosidase (lactase) est déjà appliquée dans plusieurs pays à l'échelle industrielle pour la fabrication d'un certain type de lait et notamment pour la mise en valeur du petit-lait; l'étape la plus intéressante en est la production du sirop de glucose et de galactose. Les enzymes immobilisées permettront peut-être bientôt de diriger la coagulation du lait et notamment de produire les précurseurs spécifiques d'arômes de fromage. On continue aussi de rechercher des protéases et d'autres enzymes appropriées qu'on pourra ajouter telles quelles ou encapsulées au lait de fromagerie ou au caillé pour accélérer la maturation des fromages. Le doute subsiste, toutefois, sur la mise en pratique de ces procédés, car ils seront probablement bientôt remplacés par des cultures de choix génétiquement adaptées. Toutefois, le Food Research Institute à Reading (GB) a mis au point un cocktail d'enzymes pour accélérer la maturation de fromages, qui est fabriqué à présent à l'échelle industrielle. L'utilisation d'hydrolases de peptides immobilisées sur un support est une autre nouveauté, qui sert à améliorer la digestibilité du lait. Egalement sous forme immobilisée, la lactoperoxydase, un composant naturel du système antibactérien du lait, pourrait être utilisée pour la stérilisation à froid.

Le savoir-faire acquis en génie génétique et les applications déjà éprouvées indiquent que les projets décrits seront réalisés à court ou à long terme. Les discussions en cours portent aussi sur des applications à très longue portée, qui ne seront pas mises en pratique avant longtemps (tableau 3).

Quoi qu'on pense de la nouvelle biotechnologie, l'industrie laitière ne pourra se soustraire à son influence. Elle devra essayer de suivre le rythme des progrès. La FAM, qui n'a pas tous les moyens pour aller de pair avec cette évolution, sera obligée de collaborer plus intensément avec des universités et des instituts étrangers.

Tableau 3: Futures applications du génie génétique dans le domaine des cultures bactériennes

1. Isolement des gènes responsables d'arômes de fruits dans des cellules de fruits tels que: ananas, pêches, abricots, citrons, bananes. Incorporation de ces gènes à des bactéries lactiques. Cela remplacerait l'addition d'arômes aux produits laitiers et permettrait la création de toute une gamme de nouveaux produits laitiers.
2. Construction de bactéries lactiques capables de transformer le petit-lait directement en produits finis d'arômes différents, prêts à la commercialisation.
3. Incorporation à des bactéries lactiques de gènes gouvernant la production de protéines douces, ce qui remplacerait l'addition de sucre aux produits laitiers.
4. Mise au point de microorganismes alimentaires contenant des gènes gouvernant la production d'hormones ou d'autres substances utilisées comme médicaments.
5. Incorporation de gènes responsables de la production de substances favorables à la santé de l'homme et des animaux, telles que des enzymes ou d'autres additifs alimentaires.

Source: L. McKay: Application of genetic engineering techniques for dairy starter culture improvement, dans Harlander, S.K., Labuza, T.P.: Biotechnology in food processing, Noyes Publications, Park Ridge (1986) p. 145