

Caractérisation, purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* C16

Saïda KHAOUA¹*, Nour Eddine ELHALOUI² & Gérard LEFEBVRE³

(Reçu le 23/07/1996 ; Accepté le 22/11/1996)

تمييز، تصفية و تحديد البنية الجزئية لبكتيريا الناتجة عن الجذمة C16 *Lactococcus lactis*

تنتج البكتيريا *Lactococcus lactis* C16 التي تم عزلها من الحليب البكتيريوس C16 ولها عمل جد ضيق اتجاه البكتريات اللبنية و *Lactococcus* جد حساسة لعملها حيث كيجت 17 من 22 نوعا اختبر، و تؤثر كذلك على *Bacillus* وبعض *Clostridium* وكذلك *Listeria* واحدة من ثلاثة المختبرة. البكتيريوسين C16 حساسة لمجموعة من البروتياز و هي مقاومة في وسط حامضي لمدة 20 دقيقة تحت الدرجة الحرارية 70C و تفقد 50% من فعاليتها بعد دورة من التعقيم (15 دقيقة، 120C درجة). لقد بين التحليل أن البكتيريوسين C16 الخالصة تحتوي على كتلة جزئية تناهز 8280 KD بينما أظهرت حلمة البروتين أنها تتكون من أحماض أمينية من بينها الغليسين وأحماض أمينية أخرى كارهة للماء مثل الألدن و أحماض أمينية كالأرجنين و الليزين و قد مكن التسلسل الدقيق من التعرف على 15 أحماض أمينية.

الكلمات المفتاحية : *Lactococcus Lactis* C16 - بكتيريوسين - C16 - تمييز - تصفية.

Caractérisation, purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine produite par la souche *Lactococcus lactis* C16

La production de la bactériocine C16 en milieu Elliker à 30°C, par la souche *Lactococcus lactis* C16 isolée du lait est effective après cinq heures de culture. La production volumétrique maximale est atteinte en 10 h. Cette bactériocine a un spectre d'action étroit vis-à-vis des bactéries lactiques. Les souches de *lactococcus* sont les plus sensibles à son action (17 inhibées sur 22 testées). Elle agit aussi sur *Bacillus*, quelques *Clostridium* et une souche de *Listeria* parmi les trois testées. La bactériocine C16 est sensible à plusieurs protéases. À pH acide, elle résiste à 70°C pendant 20 min et perd 50% de son activité après un cycle d'autoclavage (15min à 120°C). La bactériocine C16 a été purifiée par une méthode simple et rapide, en deux étapes : son adsorption puis sa désorption des cellules productrices, en fonction du pH et de la force ionique, suivie d'une chromatographie liquide haute performance en phase inverse. La spectrophotométrie de masse indique, pour la bactériocine purifiée, un poids moléculaire de 8,280 kD. La composition en acides aminés, de la protéine montre la prédominance de la glycine, des acides aminés hydrophobes notamment l'alanine et les acides aminés basiques (Lys et Arg). Le microséquençage de la protéine N-terminale a permis d'identifier 15 acides aminés.

Mots clés: *Lactococcus* - Bactériocine C16 - Caractérisation - Purification

Characterization, purification and partial structure determination of a bacteriocin produced by the strain *Lactococcus lactis* C16

Bacteriocin C16 is produced by *lactococcus lactis* C16 isolated from milk. The volumetric production was optimal at 30 °C in Elliker medium after 10 h of incubation. The bacteriocin presented a narrow spectrum of action essentially against lactic Bacteria. Among 22 strains of *lactococcus* tested, 17 (77 %) were sensitive to its action. Subsequent determination of the spectrum of action showed that strains of the genera *Bacillus*, *Clostridium* and *Listeria* were also sensitive. The inhibitory activity of bacteriocin C16 was affected by several proteolytic enzymes. At low pH, it resists 20 min to heat treatment of 70°C but loses 50% of its activity after heat sterilization (120°C-15 min). Bacteriocin C16 was purified by rapid and simple two steps purification procedure including adsorption and release of the bacteriocin from the producing cells at low pH followed by reverse phase high performance liquid chromatography step. The bacteriocin has a molecular weight of 8.280 kD as determined by mass spectroscopy and was shown to contain a high proportion of glycine, and hydrophobic (Ala) and basic (Lys/Arg) amino-acids after proteolytic hydrolysis. Furthermore, 15 amino-acids were identified by microsequencing analysis of the N terminal protein.

Key words : *Lactococcus* C16 - Bacteriocin C16 - Characterization - Purification

¹ Département de Biologie, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Dhar El Mehraz, Fès, Maroc

² Laboratoire de Microbiologie, Université Ibn Toufail, Kénitra, Maroc

³ Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, ENSAIA (INPL), Nancy, France

*Auteur correspondant

INTRODUCTION

La découverte des bactériocines remonte à 1925 quand Gratia observait l'inhibition de *E. coli* F par *E. coli* V. Ce type d'agents antibactériens chez *E. coli* est, par la suite, nommé colicine (Frédériq, 1948). Par ailleurs, le groupe des bactéries lactiques a montré une grande aptitude à produire des substances semblables à ces colicines. Jacob *et al.* (1953) donnèrent le terme de bactériocine à cette classe d'antagonistes. La bactériocine la plus connue (nisine), produite par une souche de *Lactococcus lactis* fut décrite par Rogers (1928). Depuis que la nisine a été autorisée comme additif alimentaire par EEC (1983) et par "American Food and Drug Administration" (Federal Register, 1988), l'étude des bactériocines des bactéries lactiques a suscité un intérêt croissant qui fut motivé, en particulier, par la capacité de certaines de ces substances à inhiber des bactéries pathogènes et par leur inocuité supposée pour l'homme par la possibilité de leur dégradation par les enzymes du tractus intestinal.

La purification puis la détermination des séquences primaires des bactériocines sont indispensables pour caractériser les molécules mises en évidence ces dernières années.

Ce travail consiste à mettre en évidence et à étudier une nouvelle bactériocine produite par la souche *Lactococcus lactis* C 16.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes et milieux de culture

La souche productrice utilisée lors de cette étude est *Lactococcus lactis* C16, isolée du lait au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire (ENSAIA, Nancy, France). Le milieu de culture retenu est celui d'Elliker *et al.* (1956).

La souche *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* CIP 116 a été utilisée comme souche indicatrice pour la détection de la production de bactériocine. La température d'incubation est de 30°C.

Les souches indicatrices et celle productrice de la bactériocine C16 sont conservées dans les milieux appropriés (Tableau 1) à -20°C, en présence de glycérol à 30% (v/v). Avant leur utilisation, elles sont repiquées deux fois à un taux de 1 à 2% (v/v).

2. Mode de dosage de la bactériocine C16

La méthode de diffusion en milieu solide est celle décrite par Tagg *et al.* (1976). Cette méthode est fondée sur l'apparition d'une zone d'inhibition, provoquée par les surnageants de cultures, contenant les bactériocines, déposés dans des puits de 5 mm de diamètre. Les bactéries indicatrices sont préalablement ensemencées, en tapis, en milieu gélosé approprié. Pour éliminer l'éventuelle activité inhibitrice due au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de la catalase est ajoutée à l'échantillon à doser à une concentration finale de 1 mg/ml. L'échantillon, dont le pH est ramené à 7, est incubé pendant 1 h à 37°C. Il est par la suite déposé à raison de 20 µl dans les puits. Les boîtes de Pétri, ainsi préparées, sont entreposées pendant 4 à 8 h à 4°C pour laisser diffuser la bactériocine dans la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant une nuit. L'effet antibactérien de la bactériocine est mis en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du puits dans lequel l'échantillon a été déposé.

L'estimation quantitative de l'activité des bactériocines est obtenue par la méthode de dilution critique (Mayr-Harting *et al.*, 1972). Le titre en bactériocine est défini comme étant l'inverse de la plus forte dilution provoquant une inhibition de la souche indicatrice. Il est exprimé en unité arbitraire (UA) par volume déposé dans le puits. On déduit ensuite le nombre des UA / ml de l'échantillon dosé.

Les essais sont réalisés en double ; la moyenne est prise comme résultat final.

3. Caractérisation de la bactériocine C16

• Préparation de l'extrait brut

La culture de *Lactococcus lactis* C16, obtenue après incubation pendant 15 h à 30°C, est centrifugée (10000 x g, 10 min) afin d'éliminer les cellules bactériennes. Le surnageant est ensuite maintenu au pH de fin de culture (pH ≈ 4) et conservé à 7°C.

• Spectre d'activité

L'étude du spectre d'activité de la bactériocine C16 a été réalisée sur un grand nombre de souches à Gram-positif (bactéries lactiques, bactéries pathogènes et bactéries d'altération) et à quelques bactéries Gram-négatif (Tableau 1)

Tableau 1. Spectre d'action de *Lactococcus lactis* C16

Les résultats sont obtenus par la méthode de diffusion en puits. Le test de l'action inhibitrice de la bactériocine C16 est considéré positif quand le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2 mm.

Genre, espèce bactérienne et origine des souches	Souches inhibées/testées	Milieux de culture
Lactococcus		
<i>Lc. lactis lactis</i> (ATTCC 1145, INRA, CNRS 481, ENSAIA (12 souches))	14/15	Elliker
<i>Lc. lactis cremoris</i> (CIP 116, ENSAIA (6 souches))	3/7	"
Lactobacillus		
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> (DSM 20011, DSM 20011 Tepral)	0/2	MRS
<i>Lb. flautarum</i> (I 432, Tepral)	"	"
<i>Lb. brevis</i> (I 423, Tepral)	"	"
<i>Lb. buchneri</i> (DSM 20249, Tepral)	"	"
<i>Lb. fermentum</i> (I 233, Tepral)	"	"
<i>Lb. alimentarius</i> (DSM 20249)	0/1	"
<i>Lb. farciminis</i> (DSM 20184)	"	"
<i>Lb. curvatus</i> (DSM 20015)	"	"
<i>Lb. delbruccki</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (I 369)	"	"
<i>Lb. acidophilus</i> (DSM 20079)	"	"
<i>Lb. lactis</i> (I 242)	"	"
<i>Lb. asake</i> (DSM 20017)	1/1	"
<i>Lb. helveticus</i> (I 303)	"	"
Leuconostococcus		
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (DSM 20240);		
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (DSM 20346);		
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranum</i> (DSM 20484);		
<i>Ln. lactis</i> (DSM 20282);	"	"
<i>Ln. paramesenteroides</i> (DSM 20282)	0/5	"
Pediococcus		
<i>P. pentosaceus</i> (ENSAIA, Tepral)	0/2	"
<i>P. acidilactici</i> (SPM 83, Tepral)	"	"
<i>P. cerevisiae</i> (CIP 5492)	0/1	"
<i>P. damnosus</i> (DSM 20282)	1/1	"
Enterococcus		
<i>E. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> (ENSAIA);		
<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> (ENSAIA);		
<i>E. faecium</i> (ENSAIA);		
<i>E. durans</i> (ENSAIA)	0/4	Elliker
Streptococcus thermophilus (I 302, ENSAIA)	0/2	"
Micrococcus luteus (ENSAIA)	0/1	BHI
Listeria		
<i>L. monocytogenes</i> (CI 822110)	0/1	"
<i>L. grayi</i> (CIP 6818)	"	"
<i>L. grayi</i> (ENSAIA)	1/1	"
Staphylococcus		
<i>S. aureus</i> (CIP 7625)	0/1	IP
<i>S. epidermidiss</i> (CIP 53134)	"	"
<i>S. xylosus</i> (ENSAIA)	"	"
Bacillus		
<i>B. stearothermophilus</i> (ENSAIA)	12/12	"
<i>B. brevis</i> ; <i>B. coagulans</i> ; <i>B. marcerans</i> ; <i>B. pasterianum</i> ; <i>B. subtilus</i> ;		
<i>B. slichemformis</i> ; <i>B. spolymyxa</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. circulans</i> ; <i>B. cereus</i> (ENSAIA)	4/10	"
Clostridium		
<i>C. perfringus</i> ; <i>C. sporogenes</i> ; <i>C. histolyticum</i> ; <i>C. bifermentans</i> (ENSAIA)	0/4	BHI
<i>C. butyricum</i> (ENSAIA)	1/1	"
<i>C. tyrobutyricum</i> (ENSAIA)	"	"
Escherichia coli Gram negatif <i>E. coli</i> (ENSAIA)	0/1	"
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ENSAIA)	0/1	"

 MRS : de Man, Rogosa & Sharpe (De Man *et al.* (1960) (Biokar) ; Elliker : Elliker *et al.* (1956) (Biokar) ; BHI: brean hearth infusion ou bouillon cœur-cervelle (Difco) ; IP : milieu Institut Pasteur (Difco)

• Action de la température et du pH sur la stabilité de la bactériocine

Des extraits bruts de bactériocine C16 sont ajustés à différents pH (2, 4 et 7) puis incubés à 70°C. À différents temps d'incubation, des prélèvements sont effectués pour déterminer l'activité résiduelle.

Dans un second essai, des fractions de 2 ml des extraits bruts de la bactériocine C16 ajustées aux pH 4, 5,5, 7, 8 et 9, d'une part, et aux pH 2, 4 et 7, d'autre part, sont soumises respectivement à un traitement thermique de 70°C et 121°C pendant 15 min. Les échantillons sont refroidis instantanément et ajustés à pH 7 avant de mesurer l'activité résiduelle.

L'effet du pH basique sur l'activité de la bactériocine C 16 à température ambiante a été étudié sur un extrait brut de 2 ml ajusté à pH 9 avec NaOH (1 N). Des prélèvements ont été effectués à une heure d'intervalle pour déterminer l'activité résiduelle.

• Action des enzymes

La nature protéique de la bactériocine est mise en évidence par l'étude de sa stabilité après traitement par différentes enzymes protéolytiques. L'extrait brut, ajusté à pH 7, est soumis à l'action de plusieurs enzymes : protéinase K (Sigma), pronase (Sigma), trypsine (Serva), α -chymotrypsine (Serva), pepsine (Serva) et ficine (Sigma). Toutes ces enzymes sont utilisées à une concentration finale de 1mg/ml et à pH 7 à l'exception de la pepsine dont l'effet a été testé à pH 3. Le mélange (surnageant + enzyme) est incubé 1 h aux températures appropriées (25 à 37°C) et l'activité antibactérienne est dosée par la méthode de dilution (Mayr-Harting *et al.*, 1972). Le témoin est constitué d'un extrait de bactériocine n'ayant pas subi de traitement enzymatique.

4. Purification de la bactériocine C16

• Adsorption puis désorption de la bactériocine C16 en fonction du pH

La bactériocine C16 a été purifiée selon la technique de Yang *et al.* (1992). Le pH d'une culture de 15 heures de la souche productrice *Lc. lactis* C16 a été ajusté à 6,5. À ce pH, le contact pendant 30 min à température ambiante des cellules productrices avec le milieu de culture permet l'adsorption de la bactériocine. La culture est ensuite chauffée à 70°C

pendant 15 min afin d'inactiver les protéases susceptibles de dégrader la bactériocine. Après refroidissement, les cellules sont récupérées par centrifugation (10 000 x g, 10 min). Le culot est lavé deux fois par centrifugation avec du tampon phosphate (5 mM, pH 6,5) pour éliminer les protéines du milieu de culture, puis repris dans 1/20 du volume initial en tampon phosphate (5 mM, pH 6,5) contenant 100 mM de NaCl. Le pH est ajusté à 2. Après une heure sous agitation à 7°C, les cellules sont centrifugées (10 000 x g, 10 min), le surnageant est récupéré et conservé à 7°C avant la purification finale par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

La concentration en protéines des différents précipités a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

• Purification par CLHP phase inverse de la bactériocine C16

La dernière étape de purification est une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse. La séparation des protéines est basée essentiellement sur la différence d'hydrophobicité permettant l'adsorption de résidus aminés superficiels non polaires sur les groupements hydrophobes de la phase stationnaire. L'éluion des protéines adsorbées s'effectue en faisant varier la polarité de la phase mobile, à l'aide de solvants organiques.

La colonne utilisée contient une phase C8 (Beckman 75-4,6 mm) équilibrée avec de l'eau à 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA), avec un débit de 1 ml/min. L'éluion de la bactériocine C 16 est obtenue en utilisant comme solvants de l'eau contenant du TFA à 0,1% (solvant A) et du méthanol avec du TFA 0,07% (solvant B).

Le gradient du solvant B au cours de la première chromatographie en CLHP de la bactériocine C16 (chromatographie de 2 ml d'un échantillon concentré après purification partielle par adsorption- désorption) est le suivant :

- 0 % de solvant B pendant 38 min;
- gradient de solvant B de 0 à 45 % durant 1 min;
- 45 % de solvant B pendant 22 min;
- gradient de solvant B de 45 à 48 % durant 1 min;
- 48 % de solvant B pendant 25 min;
- gradient de solvant B de 48% à 50% durant 5 min;
- gradient de solvant B de 50% à 54% durant 1 min;
- 54 % de solvant B pendant 16 min;

- gradient de solvant B de 54 % à 57 % durant 1 min;
- 57 % de solvant B pendant 10 min.

Le profil chromatographique est enregistré à 220 nm. Les fractions correspondant à la phase ascendente du pic n° 2 (Figure 1) sont concentrées et réinjectées. Cette rechromatographie est effectuée dans les mêmes conditions que la précédente avec un gradient différent du solvant B. Ce gradient suit l'évolution ci-dessous:

- 45 % de solvant B pendant 10 min;
- gradient de solvant B de 45 % à 48 % durant 1 min;
- 48 % de solvant B pendant 5 min;
- gradient de solvant B de 48 % à 50 % durant 6 min;
- gradient de solvant B de 50 % à 54 % durant 1 min;
- 54 % de solvant B durant 10 min;
- gradient de solvant B de 54 % à 57 % durant 1 min;
- 57 % de solvant B pendant 5 min.

Les fractions actives de la bactériocine C16 purifiée correspondant à un pic isolé sont récoltées, concentrées et gardées pour les analyses chimiques.

5. Analyses de la bactériocine C16

• Poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire de la bactériocine C16 a été effectuée, à l'aide d'un spectromètre de masse, par J.P. Lecaer (Institut A. Sessard CNRS, Gif sur Yvette, France).

• Composition en acides aminés

Cette composition a été déterminée par L. Denoroy (Service Central d'Analyse, CNRS, Vernaison, France) par CLHP après hydrolyse de la protéine.

• Séquence N-terminale

Le séquençage de la partie N-terminale de la bactériocine C16 a été effectué par L. Denoroy (Service Central d'Analyse, CNRS, Vernaison, France) par la méthode de dégradation d'Edman (1956). La partie de la séquence obtenue est comparée à d'autres bactériocines de structure primaire connue.

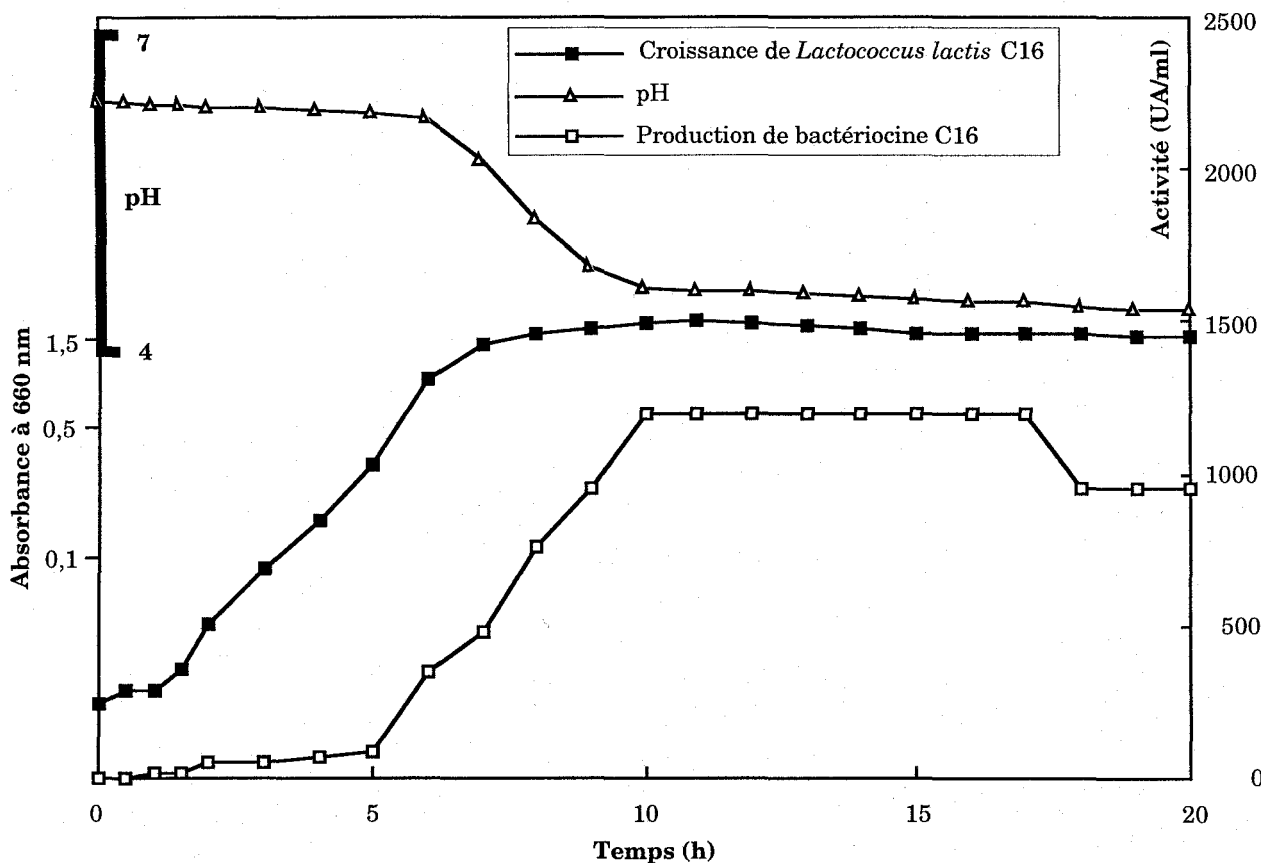


Figure 1. Évolution de la croissance de la souche *Lactococcus lactis* C16, du pH et de la production de bactériocine C16

RÉSULTATS

• Spectre d'activité de la bactériocine C16

Un grand nombre de souches bactériennes (92 bactéries à Gram positif et 2 à Gram négatif) ont été utilisées afin de déterminer leur sensibilité vis-à-vis de la bactériocine C16 (Tableau 1).

Dans le groupe des bactéries lactiques, la bactériocine C16 montre un spectre d'activité limité au genre *Lactococcus*. En effet, 17 souches de *Lactococcus* ont été inhibées sur 22 testées.

Par contre, parmi 18 souches du genre *Lactobacillus* et 6 souches du genre *Pediococcus* testées seule deux souches du premier genre et une du deuxième ont été inhibées par la bactériocine C16. Quant aux *Leuconostoc*, les cinq souches testées se sont montrées résistantes à l'action de cette bactériocine.

Par ailleurs, l'action de la bactériocine C16 a été testée sur *Bacillus*, *Clostridium* et *Listeria*. 16 souches sur 22 testées du premier genre, 2 sur 6 du deuxième et une sur trois du troisième sont sensibles à l'action de cette bactériocine.

Le reste des bactéries à Gram positif testées (appartenant aux genre *Enterococcus*, *Micrococcus* et *Staphylococcus*) et à Gram négatif (*Escherchia coli* et *Pseudomonas fluorescens*) testées n'ont pas été inhibées par la bactériocine C16.

On souligne le fait que la bactériocine C16 est active vis-à-vis de *Lactococcus lactis lactis* 1145 et *Lactococcus lactis lactis* 481 producteurs respectifs de la nisine et de la lacticine 481.

Lactococcus lactis subsp *cremoris* CIP 116 a été retenue comme souche indicatrice pour la suite du travail en raison de sa plus grande sensibilité à l'action de la bactériocine C16 (plus grande zone d'inhibition par la méthode de diffusion).

• Biosynthèse de la bactériocine C16

En culture sur milieu Elliker à 30°C, la souche *Lactococcus lactis* C16 produit la bactériocine C16. L'excrétion de cette bactériocine débute après cinq heures de culture et atteint un maximum de l'ordre de 12000 UA/ml après 10 heures de culture (Figure 2).

En fin de culture, l'activité de la bactériocine C16 baisse légèrement. La production de bactériocine s'accompagne d'une acidification parallèle du milieu.

• Action du pH et de la chaleur sur l'activité de la bactériocine C16

À pH 2 ou 4 l'activité de la bactériocine C16 reste stable pendant 20 min à une température de 70°C. Au delà de cette durée d'incubation, la bactériocine C16 perd 48% de son activité. À pH neutre, la sensibilité de la bactériocine C16 à la température est plus importante qu'à pH acide (Figure 3).

Par ailleurs, après un cycle de stérilisation (15 min à 120°C), la bactériocine C16 perd 50% de son activité à pH acide (2 ou 4) et 90% à pH neutre (7). Donc, la bactériocine C16 est plus résistante à la chaleur quand le pH est acide. À pH basique, même à température ambiante l'activité de la bactériocine C16 baisse. Cette chute est de l'ordre de 20 % après deux heures d'incubation et de 60% après cinq heures d'incubation à pH 9.

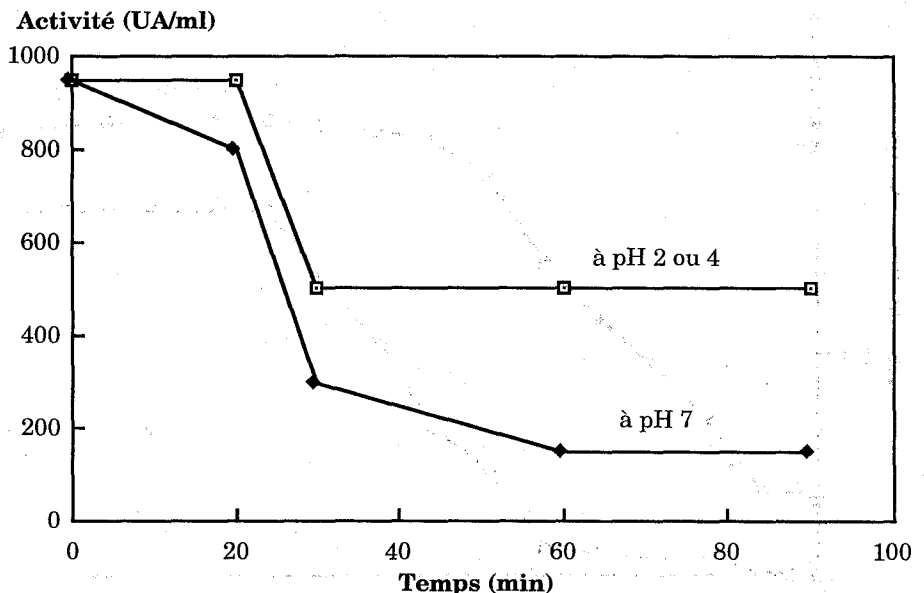


Figure 2. Effet de la durée d'incubation à 70°C sur la bactériocine C16 à pH 2 ou 4 et à pH 7

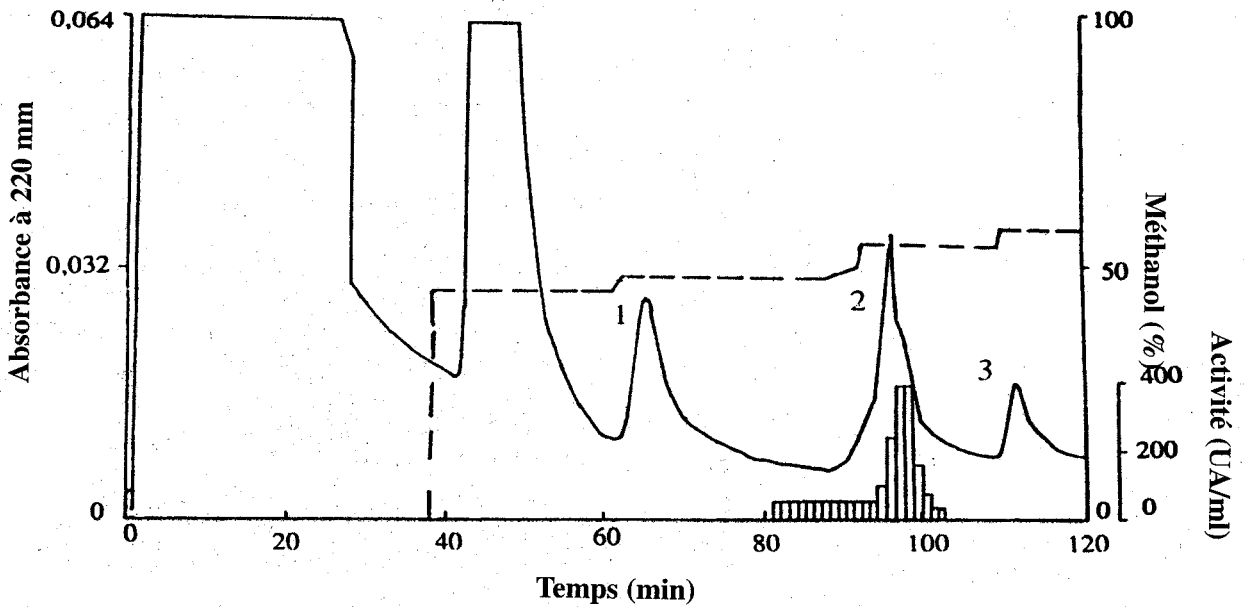


Figure 3. HPLC en phase inverse C8 de la bactériocine C16 partiellement purifiée par adsorption/désorption

Volume injecté 2 ml d'échantillon concentré
 Débit : 1 ml/min
 Solvant A : eau + TFA 0,1%
 Solvant B : méthanol + TFA 0,07%
 0 % de B pendant 38 min
 gradient de B de 0 à 45 % durant 1 min
 45 % de B pendant 22 min

gradient de B de 45 à 48 % durant 1 min
 48 % de B pendant 25 min
 gradient de B de 48% à 50% durant 5 min
 gradient de B de 50% à 54% durant 1 min
 54 % de B pendant 16 min
 gradient de B de 54 % à 57 % durant 1min
 57 % de B pendant 10 min

• **Effet de certaines enzymes sur l'activité de la bactériocine**

Plusieurs enzymes ont été utilisées afin d'étudier leur action sur l'activité de la bactériocine C16 (Tableau 2).

Tableau 2. Effet de différentes enzymes sur l'activité de la bactériocine C16 produite par *Lactococcus* C16

L' extrait acellulaire est incubé 1 h à 37°C avec 1 mg/ml de l' enzyme à pH 7, ou à pH 3 pour la pepsine. L'activité résiduelle est mesurée par la méthode des puits. La souche cible utilisée est *Lactococcus lactis cremoris* CIP 116.

Enzyme	Activité résiduelle après traitement (%)
Contrôle (sans enzyme)	100
Catalase (SIGMA)	100
Lipase (SIGMA)	100
Trypsine (SERVA)	20
Pepsine (SERVA)	0
α chymotrypsine (SERVA)	0
Ficine (SIGMA)	0

La bactériocine C16 est résistante à l'action de la lipase (Sigma) et de la catalase (Sigma) alors qu'elle est sensible aux protéases testées. L'activité de la bactériocine chute de 80% en présence de la trypsine et de 100% après traitement avec la chymotrypsine ou la ficine ou la pepsine.

• **Purification de la bactériocine C16**

La purification de la bactériocine C16 a été effectuée par la technique d'adsorption- désorption décrite par Yang *et al.* (1992). Les résultats de cette purification partielle sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3. Purification partielle de la bactériocine C16 produite par la souche *Lactococcus lactis* C16 par la technique d'adsorption-désorption décrite par Yang *et al.* (1992).

Fraction	V	AT	AS	R	DP
Extrait acellulaire	400	520 000	58	100	1
Adsorption (pH 6,5)					
Désorption (pH 2)	20	61 000	2541	11,7	44

V: Volume ; AT: Activité totale (UA) ; AS: Activité spécifique (UA/mg); R: Recouvrement ; DP: Degré de purification

Cette étape de purification a été suivie par une CLHP C8 en phase inverse (voir Matériels et Méthodes). Ainsi, a-t-on obtenu un pic isolé correspondant à la bactériocine C16 (Figure 4).

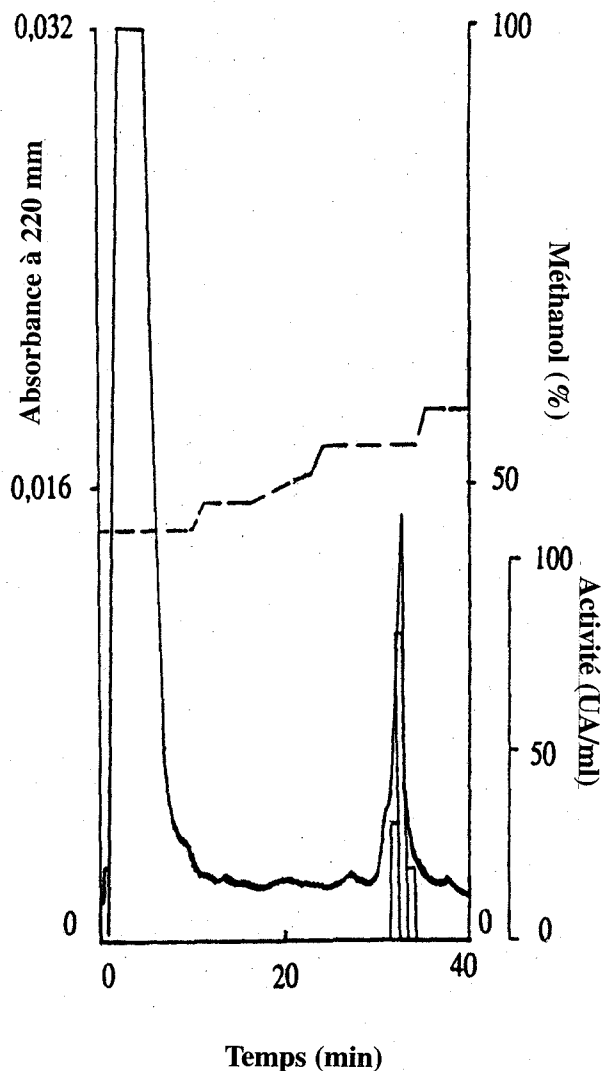


Figure 4. Rechromatographie en phase inverse C8 des fractions actives de la bactériocine C16

Volume injecté 2 ml d'échantillon concentré

Débit : 1 ml/min

Solvant A : eau +TFA 0,1%

Solvant B : méthanol + TFA 0,07%

45 % de B pendant 10 min

gradient de B de 45 à 50% durant 1 min

48 % de B pendant 5 min

gradient de B de 48 à 54 % durant 6 min

gradient de B de 50% à 54% durant 1 min

54 % de B pendant 10 min

gradient de B de 54 % à 57 % durant 1min

57 % de B pendant 5 min

Les fractions correspondantes au sommet de ce pic ont été collectées et ont servi à la détermination du poids moléculaire par spectroscopie de masse, à la détermination de la composition en acides aminés et à l'analyse de la séquence partielle (N terminale) de la bactériocine C16.

• Poids moléculaire de la bactériocine C16

L'analyse par spectroscopie de masse de la bactériocine C16 purifiée a montré un pic majoritaire correspondant à un poids moléculaire de 8 280 kD (Figure 5).

• Composition en acides aminés de la bactériocine C16

La composition en acides aminés de la bactériocine C16 pure est montrée dans le tableau 4.

Tableau 4. Composition en acides aminés de la bactériocine C16

Acides aminés	Nombres de résidus/molécule
Asx	3,9
Glx	7,1
Serine	5,4
Glycine	12,3
Histidine	1,2
Arginine	5,7
Thréonine	3,1
Alanine	12,2
Proline	4,9
Tyrosine	1,3
Valine	4,4
Méthionine	1,2
Isoleucine	3,9
Leucine	5,2
Phénylalanine	1,5
Lysine	6,5
Cystéine	ND
Tryptophane	ND

Cystéine et tryptophane sont dégradés au cours de l'hydrolyse

Glx : glutamate+glutamine

Asx : aspartate + asparagine

ND : non déterminé

La bactériocine C16 contient une proportion importante de glycine, d'acides aminés hydrophobes, essentiellement l'alanine, et d'acides aminés basiques (lysine et arginine). Aucun acide aminé non naturel tel que la lanthionone n'a été détecté.

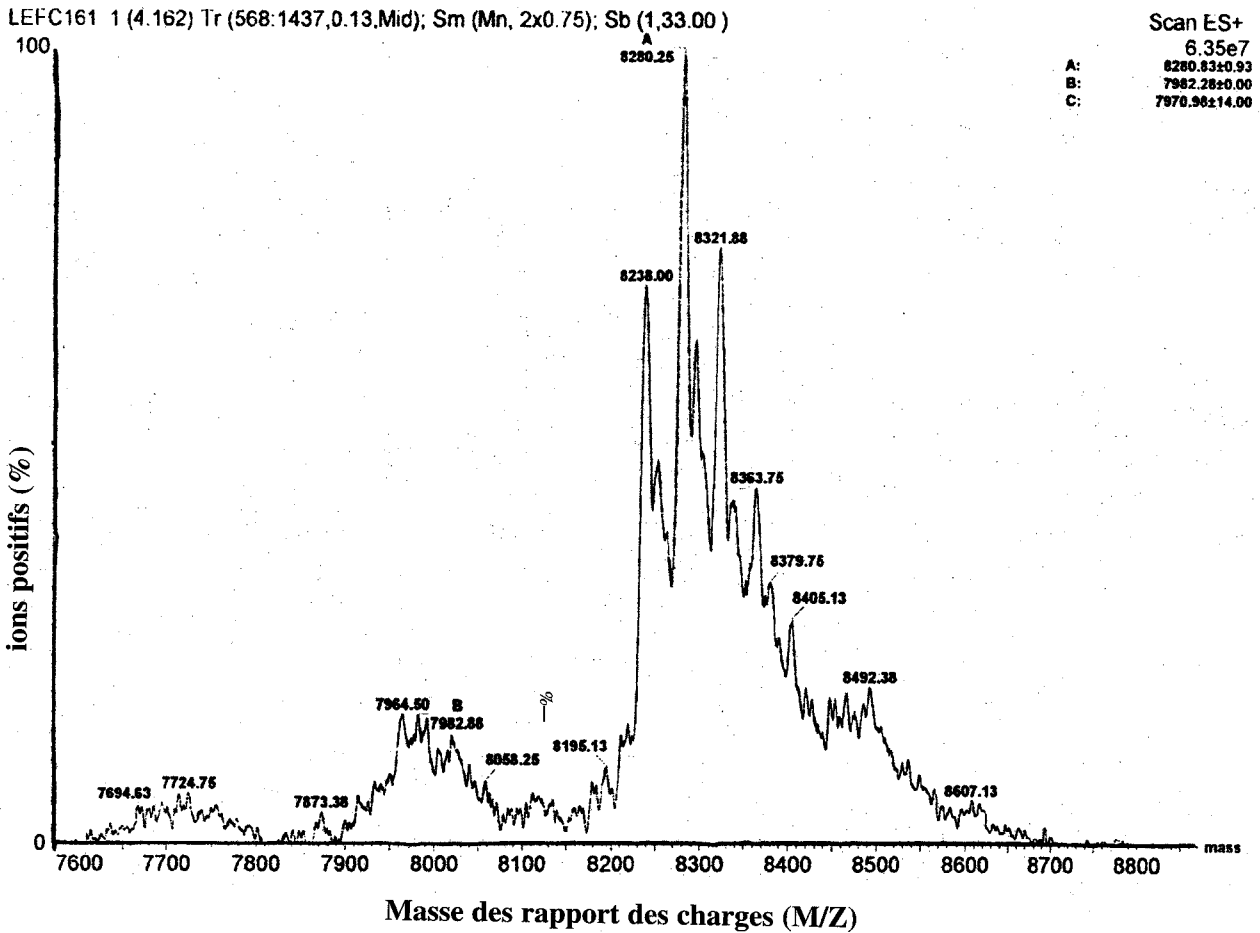


Figure 5. Estimation du poids moléculaire de la bactériocine C16 produite par *Lactococcus* C16, à l'aide d'un spectrophotomètre de masse

• Séquence N terminale de la bactériocine C16

Quinze acides aminés N terminaux ont été déterminés. Leur séquence est comparée à celles de lactococcines A, B, et M comme le montre le tableau 5.

Tableau 5. Comparaison des quinze acides aminés N-terminal des séquences des Lactococcines A, B, M (Jack *et al.*, 1995) et de ceux de la bactériocine C16 produite par *Lactococcus* C16

Bactériocines	Séquence N-terminale des 15 premiers acides aminés
Lactococcine A	KLTFIQSTAAGDLYY
Lactococcine B	SLQYVMSAGPYTWYK
Lactococcine M	IRGTGKGLAAAMVSG
Bacteriocine C16	ANIKSAIKRAELNKV

DISCUSSION

La bactériocine C 16 produite par la souche *Lc. lactis* C16, isolée du lait cru au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire à L'ENSAIA (Nancy) est active essentiellement vis-à-vis des souches du genre *Lactococcus* y compris *Lc. lactis* subsp *lactis* 1145 et *Lc. lactis* subsp *lactis* CNRS 481, producteurs respectifs de la nisine et de la lacticine 481.

La bactériocine C16 est donc différente de ces deux bactériocines. Par ailleurs, elle est différente des lactostrepsines, produites par les espèces du même genre, qui sont actives seulement à pH acide (Kozak *et al.*, 1978), alors que la bactériocine C16 est active aussi à pH neutre.

À pH acide, les diplococcines sont thermostables (30 min à 100°C), aussi ces bactériocines ont un

spectre d'activité limité au genre *Lactococcus* (Oxford, 1944). Nos résultats montrent que la bactériocine C16 est moins thermostable que les diplococcines et que son spectre d'activité est plus large que celui de ces dernières.

La bactériocine C16 produite par la souche *Lactococcus lactis* C16 serait différente des bactériocines les plus connues du genre de *Lactococcus* (nisine, lacticine 481, lactostrepsine et diplococcine). Cette observation nous a motivé afin de purifier la bactériocine C16.

La purification des bactériocines produites par les bactéries lactiques montre certaines difficultés dues à la concentration élevée en protéines dans l'extrait acellulaire, à la tendance de certaines bactériocines à s'associer avec d'autres molécules et à la nature hydrophobe de ces bactériocines (Van-Laak *et al.*, 1992).

La technique d'adsorption-désorption décrite par Yang *et al.* (1992) peut servir d'alternative pour la purification de ces bactériocines. En comparaison avec les techniques classiques de purification des protéines, cette méthode d'adsorption-désorption semble être plus économique, plus rapide et reproductible (Piard *et al.*, 1992).

La purification par CLHP de la bactériocine C16 montre que cette dernière est éluée à 54% de méthanol, ce qui correspondrait à une élution des protéines hydrophobes. La composition en acides aminés de la bactériocine C16 confirme cette hypothèse. Cette analyse ne montre pas la présence d'acides aminés non usuels.

Par ailleurs, la comparaison des quinze acides aminés de la séquence N terminale des Lactococcines A, B, M et de ceux de la séquence N terminale de la bactériocine C16 (Tableau 5) montre que ces molécules sont différentes.

L'activité de la lactococcine G est associée à la présence de trois peptides $\alpha 1$, $\alpha 2$ et β (Meyer *et al.*, 1992). Les quinze acides aminés de la séquence N terminale de ces peptides sont différents de ceux de la séquence N terminale de la bactériocine C16.

Par ailleurs, La bactériocine C16 est différente de la lactococcine DR dont le poids moléculaire est plus petit (2,3 à 2,4 kD).

Donc, la bactériocine C16 est une nouvelle bactériocine produite par *Lactococcus* C16. Par ailleurs, la détermination de la séquence N-

terminale de la bactériocine C16 servirait d'outil de travail pour isoler et étudier le gène codant pour cette protéine.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Daba H., Lacroix C., Huang J., Simard R. E. & Lemieux L. (1994) Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5 *J. of Appl. Bacteriol.* 77 : 682-88
- Edman P. (1956) On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Acta. Chem. Scand.* 10 : 761-768
- EEC (1983) EEC Commission Directive 83/463/EEC
- Elliker P.R., Anderson A.W. & Hanneson G. (1956) An agar culture medium for lactic streptococci and lactobacilli. *J. Dairy. Sci.* 39 : 1611-1612
- Federal Register (1988) Nisin preparation : affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Reg.* 53 : 11247-51
- Frédériq P. (1948) Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.* 19 : 1-17
- Gratia A. (1925) Sur un remarquable exemple d'antagoniste entre souches de colibacille. *C.R. Soc. Biol.* 93 : 1041-1
- Jack R. W., Tagg J. R. & Ray B. (1995) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 : 171-200
- Jacob F., Lwoff A., Siminovitch A. & Wollman E.L. (1953) Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Int. Pasteur* 84 : 222-4
- Kozak W., Bardowski J. & Dobrzanski W.T. (1978) Lactostrepsins-acid bacteriocins produced by lactic *Streptococci*. *J. Dairy Res.* 45 : 247-257
- Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L. & Randall R.G. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-271
- Mayer-Harting A., Hedges A.G. & Berkely R.C.W. (1972) Methods for studying bacteriocins. In "Methods in microbiology". Norris R.J. & Ribbons D.W. (ed) Academic Press, New York. pp. 315-422
- Meyer J.N.; Holo H., Havarstein L.S., Sletten K. & Nes I. (1992) A novel Lactococcal Bacteriocin Whose activity Depends on the complementary Action of Two Peptides. *J Bacteriol.* 5686-5692

Muriana P.M. & Klaenhammer T.R. (1991) Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 114-121

Oxford A.E. (1944) Diplococcin, an anti-microbial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem. J.* 38 : 178-182

Piard J.C., Muriana P.M., Desmazeaud M. & Klaenhammer T.R. (1992) Purification and partial characterization of lactacin 481, α lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 279-284

Rogers L. A. (1928) The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 16 : 321-5

Rince A., Dufour A., Lepogam S., Thuault D., Bourgeois C. M. & Lepennec J. P. (1994) Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* App. and *Envir. Microbiol.* 60 : 1652-57

Tagg J. R., Dajani A. S. & Wannamaker L. W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40 : 722-756

Van Laack R. L.M.J., Schillinger, U. & Holzapfel, W. (1992). Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA 44A. *Int. J. Food Microbiol.* 16 : 183-195.

Yang R., Johnson M.C. & Ray B. (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3355-3359