



HAL
open science

Études des propriétés d'une bactériocine anti-Listeria, biosynthétisée par une souche de Carnobacterium

Florence Mathieu

► **To cite this version:**

Florence Mathieu. Études des propriétés d'une bactériocine anti-Listeria, biosynthétisée par une souche de Carnobacterium. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français. NNT : 1994INPL017N . tel-01751329

HAL Id: tel-01751329

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751329>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire

THESE

présentée à l'INPL par

Florence MATHIEU

BIU NANCY

Service Commun de Documentation
INPL

2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

**Etude des propriétés d'une bactériocine anti-*Listeria*,
biosynthétisée par une souche de *Carnobacterium***

soutenue publiquement Jeudi 10 Février 1994 à 14 h devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury :

Président

G. LEFEBVRE, Professeur
(INPL Nancy)

Rapporteurs

A. DESCHAMPS, Professeur
(Université de Bordeaux)

G. NOVEL, Professeur
(Université de Caen)

Examineur

P. GERMAIN, Professeur
(INPL Nancy)

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire

(M) 1994 MATHIEU, F.

THESE

présentée à l'INPL par

Florence MATHIEU

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

**Etude des propriétés d'une bactériocine anti-*Listeria*,
biosynthétisée par une souche de *Carnobacterium***

soutenue publiquement Jeudi 10 Février 1994 à 14 h devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury :

- | | |
|--------------------|--|
| Président | G. LEFEBVRE, Professeur
(INPL Nancy) |
| Rapporteurs | A. DESCHAMPS, Professeur
(Université de Bordeaux) |
| | G. NOVEL, Professeur
(Université de Caen) |
| Examineur | P. GERMAIN, Professeur
(INPL Nancy) |

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire, de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agro-Alimentaires (ENSAIA) à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), sous la direction de Monsieur le Professeur Gérard LEFEBVRE. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de l'honneur qu'il m'a fait de présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Alain DESCHAMPS, Professeur à l'Université de Bordeaux, ainsi qu'à Monsieur Georges NOVEL, Professeur à l'Université de Caen, tous deux ayant volontiers accepté d'être rapporteurs de cette thèse. J'associe également à ces remerciements Monsieur Pierre GERMAIN, Professeur à l'ENSAIA, pour avoir bien voulu examiner ce document.

Ce travail ayant fait l'objet d'un contrat CIFRE entre l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) et Bio France Réactifs et Développement appartenant au groupe Bio Sérum Europe, je tiens à remercier Messieurs Pontalier et Mellet pour avoir contribué à la réalisation de ce contrat.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame Monique MICHEL et Messieurs Ahmed LEBRIHI, Roland MATHIS et Jean-Bernard MILLIERE qui se sont montrés disponibles à mon égard et pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'exécution de ce travail.

Pour leur constante disponibilité, leur savoir faire et leur gentillesse à mon égard, je tiens à remercier Mesdemoiselles Michèle TURBAN et Isabelle DOSDA ainsi que Madame Andrée BODEVING.

Une pensée particulière pour chacun des thésards du Laboratoire : Idwan, Nadji, Fatima-Zohra, Abdelmajid, Valérie, Sabine, Nora, Jean-Michel mais aussi, Anne, Jean-Jacques, Sophie, Mohamed, José, Aung, Lisdar, Chouki, Aziza, Anissa, Catherine, Daniel.

Enfin, je tiens à remercier ma Famille pour son continuel soutien, sa compréhension et sa bonne humeur pour m'aider à franchir cette période.

RESUME

Un isolat de *Carnobacterium piscicola* codé CP5, provenant d'un fromage à pâte molle en fin d'affinage, exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de certaines bactéries à Gram positif, notamment des bactéries phylogénétiquement proches (autres souches de *Carnobacterium*). Cette activité, nommée carnocine CP5, est détruite par des protéases ou par autoclavage en milieu alcalin. En présence d'agents dissociant les complexes protéiques, l'activité apparaît liée à une molécule ayant un PM apparent compris entre 3 et 5 kDa. Le caractère producteur de carnocine CP5 peut être perdu après curage d'ADN plasmidique. L'ensemble des caractères précédents indique que l'action serait due à une molécule de type bactériocine. Elle exerce une action bactéricide, avec lyse des cellules, sur plusieurs souches de *Listeria monocytogenes*, aussi bien en croissance, qu'à l'état non proliférant. La molécule responsable de l'activité, après production en fermenteur dans un milieu régulé à pH 7.0, a pu être purifiée en plusieurs étapes : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographies d'échanges d'ions puis d'interactions hydrophobes et finalement CLHP en phase inverse. Cette dernière technique a permis de séparer deux fractions purifiées actives notées CP51 et CP52. Une partie de la séquence N-terminale en acides aminés de la molécule présente dans la fraction CP51, déterminée par dégradation récurrente d'Edman, a pu être établie : elle contient notamment une séquence -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val- déjà trouvée récemment par d'autres auteurs dans des bactériocines de certaines bactéries présentant une activité anti-*Listeria*.

SOMMAIRE

PAGE

AVANT-PROPOS

RESUME

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

OBJET DU TRAVAIL

1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 Brefs rappels sur les bactéries lactiques

4

1.1 La fermentation

4

1.2 Les voies fermentaires

5

1.3 Le genre *Carnobacterium*

6

1.3.1 Historique

6

1.3.2 Description

8

1.3.2.1 Morphologie

8

1.3.2.2 Conditions culturelles

9

1.3.2.3 Type fermentaire

10

1.3.2.4 Chimio-taxonomie

11

1.3.2.5 Habitat

11

1.3.3	Identification des bactéries du genre <i>Carnobacterium</i>	12
1.3.3.1	Caractères phénotypiques et chimio-taxonomiques	12
1.3.3.2	Caractères génotypiques	14
CHAPITRE 2	Les bactériocines des bactéries lactiques	17
2.1	Qu'est ce qu'une bactériocine ?	18
2.2	Nomenclature des bactériocines	21
2.3	Les bactériocines, de nouveaux agents de conservation ?	22
2.4	Les bactériocines anti- <i>Listeria</i>	24
CHAPITRE 3	Les bactériocines produites par les bactéries du genre <i>Carnobacterium</i>	27
3.1	Spectre d'activité	27
3.2	Propriétés physico-chimiques	29
3.3	Production des bactériocines des carnobactéries	31
3.4	Mode d'action des bactériocines des carnobactéries	32
3.5	Purification des bactériocines des carnobactéries	34
	3.5.1 Obtention de molécules pures	34
	3.5.2 Analyse de la structure	36
3.6	Génétique des bactériocines des carnobactéries	38
	3.6.1 Cure plasmidique	38
	3.6.2 Mobilisation des plasmides par conjugaison	39
	3.6.3 Clonage des fragments d'ADN codant pour la biosynthèse des bactériocines	41

RESULTATS

SOMMAIRE DES RESULTATS	43
Publication N°1 Presence of <i>Carnobacterium</i> spp. in French surface mould-ripened soft-cheese	46
Publication N°2 Properties of a bacteriocin produced by <i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	54
Publication N°3 Characterization and plasmid-linkage of carnocin CP5, an anti- <i>Listeria</i> bacteriocin produced by <i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	61
Publication N°4 Purification and partial amino-acid sequence of carnocin CP5, an anti- <i>Listeria</i> bacteriocin produced by <i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	88
Publication N°5 Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain <i>Carnobacterium piscicola</i> CP5 on the viability of <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures	105
CONCLUSION	133
PERSPECTIVES	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141

ABREVIATIONS

A	: absorbance
A.	: <i>Aeromonas</i>
APT	: all purpose tryptone
ATCC	: American Type Culture Collection
Bac ⁻	: non producteur de bactériocine
Bac ⁺	: producteur de bactériocine
Bac ^P	: producteur partiel de bactériocine
BHI	: brain heart infusion (bouillon coeur-cervelette)
BU	: activité antagoniste (méthode de microtitration sur plaque)
C.	: <i>Carnobacterium</i>
CIP	: Collection de l'Institut Pasteur
Da ou kDa	: Dalton ou kilo Dalton
DAP	: acide diaminopimélique
DSM	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E.	: <i>Enterococcus</i>
EB ou TSYE	: trypticase soja (30g.l ⁻¹) et extrait de levure (6 g.l ⁻¹)
EDTA	: acide éthylène diamine tétra acétique
ENSAIA	: Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
FDA	: Food and Drug Administration
g	: nombre de gravitation
GRAS	: Generally Recognized As Safe (souches utilisées dans les procédés alimentaires)
h	: heure
HIC	: chromatographie d'interactions hydrophobes
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
kpb	: kilo paires de bases
L.	: <i>Listeria</i>
Lb.	: <i>Lactobacillus</i>
Lc.	: <i>Lactococcus</i>
LMA	: Laboratoire de Microbiologie Alimentaire
Ln.	: <i>Leuconostoc</i>

Lys	: lysine
M	: molarité
M17	: milieu semi-synthétique pour lactocoques (Terzaghi et Sandine, 1975)
min.	: minute
mol.l ⁻¹	: mole par litre
MRS	: de Man, Rogosa et Sharpe (1951)
NCDO	: National Collection of Dairy Organisms
nm	: nanomètre
ORF	: open reading frame (cadre ouvert de lecture)
P.	: <i>Pediococcus</i>
PAGE	: électrophorèse en gel de polyacrylamide
PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
PM ou MW	: poids moléculaire ou molecular weight
PTH	: dérivé phénylthiohydantoïne
Rogosa	: Rogosa <i>et al.</i> , 1951
S.	: <i>Staphylococcus</i>
SDS	: dodecyl sulfate de sodium (laurate de sodium)
sp.	: espèce
spp.	: genre
ssp.	: sous espèce
TFA	: acide trifluoroacétique
Tris	: tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UA	: unité arbitraire (méthode des puits)
ufc	: unité formant colonie
UHT	: ultra haute température
UV	: ultra violet
v/v	: volume pour volume
Xaa	: acide aminé inconnu

OBJET DU TRAVAIL

OBJET DU TRAVAIL

Ce travail s'est placé dans le cadre d'un programme de recherche sur les bactériocines de bactéries lactiques, débuté au printemps 1990, sous la direction de Monsieur le Professeur Gérard Lefebvre, dans le laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Nancy.

Les bactériocines sont des protéines à activité antibactérienne. Leur spectre d'activité est plus ou moins large . Il peut être restreint à des souches de la même espèce ou à des espèces très proches (définition originelle, comme dans le cas des colicines) ou il peut être plus large dans d'autres cas, comme pour la nisine qui est active sur de nombreux genres de bactéries à Gram positif.

L'étude des bactériocines produites par les bactéries lactiques présente plusieurs pôles d'intérêt :

⇒ du point de vue de la connaissance de mécanismes biologiques, les bactériocines peuvent servir de modèles pour des études sur la régulation de la biosynthèse de protéines qui sont excrétées chez les bactéries à Gram positif (avec dans certains cas, des remaniements post-traductionnels), sur les mécanismes moléculaires de l'excrétion des protéines chez les bactéries, sur les déterminants génétiques de leur biosynthèse (chromosomique ou plasmidique selon les cas), sur les mécanismes d'action de ces protéines (souvent hydrophobes) au niveau des membranes plasmiques des procaryotes.

⇒ du point de vue pratique, les bactériocines ouvrent des perspectives d'application, comme conservateurs (agents anti-microbiens) dans certains aliments, en alternative au moins partielle, à des conservateurs chimiques aujourd'hui plus ou moins contestés, mais indispensables (nitrates, sulfites). En effet, le fait qu'elles soient de nature protéique, donc en principe biodégradables par des enzymes digestives en acides aminés non toxiques, laisse espérer qu'elles pourraient ne présenter aucun inconvénient de toxicité pour l'homme ou l'animal. De plus, comme elles sont produites par des bactéries lactiques déjà traditionnellement utilisées dans l'alimentation et réputées saines (GRAS : Generally Recognized As Safe), on peut espérer ne pas craindre d'impuretés nocives dans les préparations semi purifiées à partir de cultures de ces bactéries "Food Grade". Bien sûr,

malgré ces hypothèses raisonnables, la non toxicité de ces composés devra être vérifiée dans chaque cas pour obtenir des autorisations légales d'utilisation.

Pour ce qui est de la part que j'ai prise dans ce travail, elle a concerné différents aspects:

- en collaboration avec un thésard et un étudiant en DEA, une participation à la sélection de nouvelles souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines, notamment à activité anti-*Listeria*, par criblage de souches de bactéries lactiques isolées de différents aliments.

- l'étude des propriétés apparentes des bactériocines, dans les extraits acellulaires bruts de culture de deux souches de *Leuconostoc* et d'une souche de *Lactobacillus curvatus* en collaboration avec un thésard. Ces travaux ont fait l'objet de publications (Mathieu *et al.*, 1993a ; Sudirman *et al.*, 1993 ; Sudirman *et al.*, 1994).

- depuis décembre 1991, l'étude des propriétés apparentes d'une bactériocine produite par une souche de "lactobacille atypique" (psychrotrophe et acido-sensible), isolée au laboratoire d'un fromage de type Brie. Seuls ces derniers travaux sont présentés dans ce manuscrit et abordent les aspects suivants :

- * l'identification de la souche CP5 au genre *Carnobacterium* par des tests phénotypiques et génotypiques. La souche est identifiée à l'espèce *C. piscicola* et elle est codée CP5. Pour la première fois, à notre connaissance, la présence de carnobactéries est mise en évidence dans les produits laitiers. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec J.B. Millière et M. Michel.

- * la détermination des propriétés apparentes de la bactériocine produite par cette souche et appelée carnocine CP5, dans un extrait acellulaire brut de culture. Elle a notamment une action anti-*Listeria*.

- * un essai de purification de la carnocine CP5 qui conduit à l'obtention de deux pics d'activité, CP51 et CP52, en sortie d'HPLC. Pour le moment seul le pic CP51 a été exploité et une séquence partielle en acides aminés de l'extrémité N-terminale a été obtenue par la dégradation récurrente d'Edman.

* une approche préliminaire du déterminisme génétique de la biosynthèse de la carnocine CP5 est abordée par des essais d'obtention de variants, non producteurs de bactériocine et sensibles à celle-ci, après curage avec un agent chimique, la novobiocine. Une première tentative de recherche de la localisation plasmidique (ou non) des gènes de production et de résistance a été effectuée grâce à l'établissement des profils d'ADN plasmidique des mutants en comparaison avec celui du parent.

* une approche préliminaire du mode d'action de la carnocine CP5 vis-à-vis de *L. monocytogenes* ATCC 15313. Deux aspects sont développés : d'une part, l'addition de la carnocine CP5, partiellement purifiée, à des cellules cibles en croissance ou au repos, d'autre part l'action de la souche productrice *C. piscicola* CP5 sur *L. monocytogenes* en coculture.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

BREFS RAPPELS SUR LES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries à Gram positif, non sporulées, produisant leur énergie par fermentation et hétérogènes par leur morphologie (coque ou bâtonnet), leur physiologie et leur niche écologique. La propriété qui les rassemble est la production d'acide lactique en quantités notables, d'environ 50% (hétérofermentaires) à 90% (homofermentaires), lors de la fermentation des hydrates de carbone. Selon Kandler (1983), *sensu stricto*, les bactéries lactiques appartiennent à deux familles différenciées par leur morphologie cellulaire. La famille des *Streptococaceae*, comprenant des coques et des formes coccoïdes, regroupe principalement les genres *Lactococcus* (Schleifer, 1987) *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. La famille des *Lactobacillaceae*, avec des cellules en forme de bâtonnet, ne comporte que le seul genre *Lactobacillus*. *Sensu lato*, le genre *Bifidobacterium* est apparenté au groupe des bactéries lactiques. Grâce à des études sérologiques et à des homologies avec la séquence de l'ARN 16S, les bactéries lactiques, sauf le genre *Bifidobacterium*, sont reliées phylogénétiquement. Ainsi, avec le genre *Bacillus*, elles forment un "supercluster" dans la sous-branche des eubactéria à Gram positif alors que les bifidobactéries avec les Actinomycétales appartiennent à la deuxième sous-branche des eubactéria à Gram positif (Kandler, 1983). Officiellement, le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles ayant des caractères particuliers (Collins *et al.*, 1987) n'est pas encore apparenté aux bactéries lactiques et sa position phylogénétique n'est pas encore précisée au sein de ce groupe de bactéries.

1.1 LA FERMENTATION

Les bactéries lactiques sont caractérisées par la production importante d'acide lactique à partir de la dégradation d'hydrates de carbone. Cette fermentation est spontanée dans de nombreux produits alimentaires : lait, viande, poisson, végétaux, graines, fruits. Les bactéries lactiques peuvent atteindre une population de 1.10^8 à 1.10^9 ufc par gramme de produit en fin de fermentation. Selon le potentiel redox du substrat, d'autres métabolites sont produits comme l'acétate en conditions aérobies ou l'éthanol en conditions anaérobies. La fermentation reste dans certaines conditions un procédé technologique naturel et empirique, non contrôlé, comme dans le cas d'ensilages, de choucroute, de marinades. Le développement des bactéries lactiques, leur compétition avec les flores contaminantes ou pathogènes peut modifier de façon favorable ou non l'aspect, la texture, les qualités

hygiéniques et nutritionnelles du produit (Sharpe, 1962b). Actuellement, à l'échelle industrielle, la fermentation est dirigée par l'emploi de bactéries lactiques sélectionnées, ajoutées à un milieu (substrat) préalablement traité (pasteurisation, thermisation). La maîtrise de la fermentation lactique est l'objectif à atteindre pour obtenir des fabrications standards, reproductibles. Le rôle important des bactéries lactiques dans la conservation des produits fermentés ou semi-conserves tient à leur action antagoniste vis-à-vis des flores indésirables par la production importante d'acide lactique et à un degré moindre d'acétate ou d'éthanol, de diacétyl, de peroxyde d'hydrogène et pour certains isolats de bactériocines.

1.2 LES VOIES FERMENTAIRES

Dans le genre *Lactobacillus*, l'ancienne classification d'Orla-Jensen (1919), fondée sur des caractères phénotypiques (type fermentaire, température optimale de croissance) proposait une subdivision en trois groupes ou sous-genres : *Thermobacterium*, les homofermentaires obligatoires ; *Streptobacterium*, les hétérofermentaires facultatifs ; et *Betabacterium*, les hétérofermentaires obligatoires. En 1986, une classification fondée sur des résultats d'hybridation ADN-ADN (Kandler et Weiss) reprend celle établie par Orla-Jensen (1919) et propose de nommer ces 3 groupes sous les termes de Groupes I, II et III, respectivement. Des travaux récents (Collins *et al.*, 1991) fondés sur l'analyse de la séquence d'ARN ribosomiques montrent une grande hétérogénéité phylogénétique au sein de ces trois groupes. La classification phylogénétique ne correspond à aucune précédemment déterminée et propose les "clusters", 1, 2 et 3. Pour exemple, le "cluster" 2 est le groupe de *Lb. casei* qui rassemble 32 lactobacilles et 5 pédiocoques dont *P. damnosus* l'espèce-type du "cluster".

Le genre *Lactobacillus*, ainsi sujet à de nombreux remaniements, métabolise les hydrates de carbone par trois voies majeures différentes qui génèrent de l'ATP et des acides faibles. La division de ce genre peut alors se faire selon trois groupes physiologiques (Sharpe, 1962a ; London, 1976 ; Desmazeaud, 1992).

Les lactobacilles du groupe I ou homofermentaires obligatoires ont un métabolisme homolactique où le seul produit de fermentation est l'acide lactique, avec la transformation caractéristique de l'hexose en deux trioses par une aldolase. La voie de dégradation est la glycolyse selon la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Chaque mole de glucose donne deux moles d'acide lactique. Deux moles d'ATP sont produites et l'oxydation du coenzyme NADH permet à la glycolyse de se poursuivre. Une lactate déshydrogénase stéréospécifique

réduit le pyruvate en acide lactique D(-) ou L(+); le racémique DL peut être obtenu grâce à une racémase. Les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés par ce groupe.

Les lactobacilles du groupe II, hétérofermentaires facultatifs, peuvent métaboliser les hexoses en acide lactique par la glycolyse. C'est d'ailleurs la voie préférentielle. Mais dans des conditions où la source carbonée est limitante, le glucose entre dans la voie du 6-phosphogluconate; un dégagement de CO₂ est observé et des quantités équimolaires de lactate, de CO₂ et d'acétate/éthanol (selon le potentiel redox du système) sont obtenues. Les pentoses sont fermentés en acides lactique et acétique par la phosphocétolase inductible. Certains de ces lactobacilles, au niveau du pyruvate, possèdent un métabolisme particulier pour éliminer ce produit toxique pour la cellule. Le pyruvate peut être réduit par une lactate déshydrogénase pour donner de l'acide lactique (fin de la glycolyse). Il peut être transformé en acétyl CoA, permettant alors la formation d'acétate/éthanol, selon le potentiel redox du système, par deux complexes enzymatiques: l'un, la pyruvate formiate lyase qui produit du formiate, l'autre la pyruvate déshydrogénase qui induit un dégagement de CO₂ par l'intermédiaire d'une pyruvate décarboxylase (Fig. 1).

Les lactobacilles du groupe III, hétérofermentaires obligatoires, ont un métabolisme hétérolactique. Par la voie du 6-phosphogluconate, l'hexose phosphate est décarboxylé en pentose phosphate (dégagement de CO₂) qui sous l'action d'une phosphocétolase donne de la glycéraldéhyde-3-phosphate et de l'acétyl-phosphate (Lindgren et Dobrogosz, 1990). Ces lactobacilles produisent des quantités équimolaires de lactate, de CO₂, d'acétate ou d'éthanol (en fonction du potentiel redox du système), ainsi qu'une seule mole d'ATP. Les pentoses peuvent entrer dans la voie du 6-phosphogluconate directement au niveau de la phosphocétolase, n'entraînant pas de dégagement de CO₂ (voie des pentoses phosphates).

1.3 LE GENRE *CARNOBACTERIUM* (Collins *et al.*, 1987)

1.3.1 HISTORIQUE

En 1957, Thornley obtient, à partir de poulet irradié, des isolats ayant des propriétés physiologiques communes à celles des lactobacilles, mais incapables de croître sur un milieu acétate agar à pH 5,5 (Rogosa *et al.*, 1951), utilisé pour l'isolement sélectif des lactobacilles. D'autres auteurs mentionnent également des difficultés à identifier des lactobacilles atypiques provenant de produits carnés (Sharpe, 1962b; Reuter, 1975; Barnes, 1976; Sharpe, 1979; Reuter, 1981).

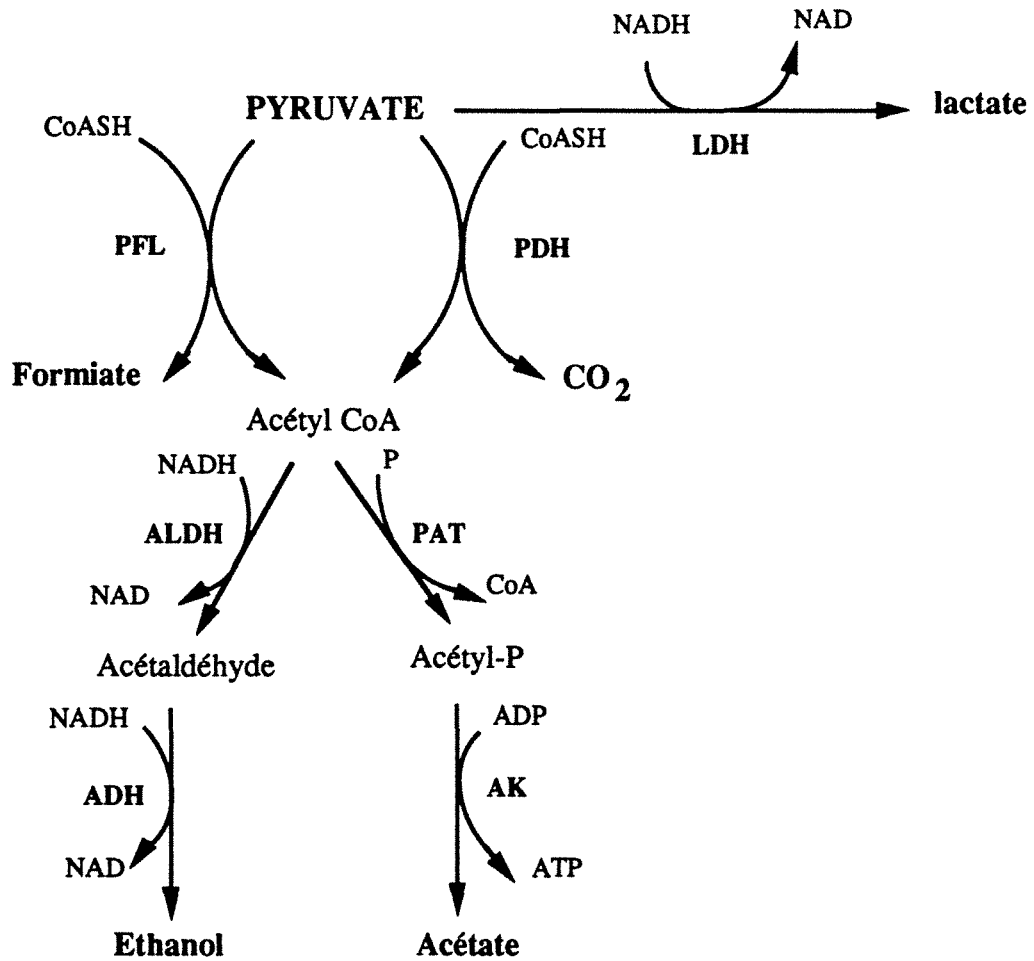


Figure 1 : Devenir du pyruvate chez les lactobacilles du groupe II, hétérofermentaires facultatifs

LDH, Lactate Déshydrogénase ; **PFL**, Pyruvate Formiate Lyase ; **PDH**, Pyruvate Déshydrogénase ; **ALDH**, Aldéhyde Déshydrogénase ; **PAT**, Phosphate Acétyltransférase ; **ADH**, Alcool Déshydrogénase ; **AK**, Acétate Kinase

Certains les identifient à des lactobacilles hétérofermentaires atypiques (Hitchener *et al.*, 1982), des streptobacteria atypiques non aciduriques (Shaw et Harding, 1984) ou encore à des streptobacteria non identifiées (Niemand et Holzapfel, 1984).

De nouvelles espèces placées au sein du genre *Lactobacillus* sont ainsi définies. En 1983, Holzapfel et Gerber décrivent *Lactobacillus divergens* DSM 20623, espèce hétérofermentaire appartenant au groupe des *Betabacterium*. Cependant, cette espèce présente des caractères "déviant" (production très faible de CO₂, pH limite de croissance voisin de 5,0) par rapport au groupe des hétérofermentaires stricts. En 1984, Hiu *et al.* définissent et proposent l'espèce *Lactobacillus piscicola* ATCC 35586 pour l'identification des lactobacilles isolés de truites malades. En 1985, Shaw et Harding proposent l'espèce *Lactobacillus carnis* NCDO 2764 pour des lactobacilles atypiques isolés de viandes conservées sous vide. Mais une faible production de CO₂ à partir du glucose et un rapport acétate-éthanol sur lactate faible suggèrent pour ces lactobacilles atypiques une identification inadéquate.

Afin de préciser la taxonomie de ces lactobacilles atypiques, Collins *et al.* (1987) conduisent des études biochimiques, chimiques et physiologiques. Ces lactobacilles sont ainsi regroupés dans un nouveau genre, *Carnobacterium*, comprenant quatre espèces : *C. piscicola* NCDO 2762, *C. divergens* NCDO 2763 (espèce type du genre), *C. mobile* NCFB 2765 et *C. gallinarum* NCFB 2766. Récemment, deux nouvelles espèces hétérofermentaires et psychrotrophes ont été décrites, isolées d'un lac de l'Antarctique, *C. funditum* et *C. alterfunditum* (Franzmann *et al.*, 1991).

1.3.2. DESCRIPTION

1.3.2.1. Morphologie

Le genre *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987) regroupe des bactéries à Gram positif, en bâtonnets minces et droits, non sporulés. Les cellules sont soit isolées, soit par paire (dans ce cas, la liaison entre les deux cellules forme un large V) soit le plus souvent en courtes chaînes. Les cellules peuvent être mobiles ou non mobiles.

1.3.2.2. Conditions culturelles et physiologie

Les carnobactéries sont anaérobies facultatives. Leur croissance est observée à 10°C et la plupart des isolats peuvent croître à 0°C (caractère psychrotrophe), mais pas à 45°C. Les carnobactéries se caractérisent par une absence de croissance sur le milieu acétate agar à pH 5,5 (Rogosa *et al.*, 1951) ou en présence de 10% de NaCl (Holzapfel et Gerber, 1983). La croissance des carnobactéries est peu dense sur le milieu MRS à un pH initial de 6,4 (de Man *et al.*, 1960). D'ailleurs, à la suite de repiquages successifs sur MRS, les souches sont souvent perdues. Un milieu MRS sans acétate (Holzapfel et Gerber, 1983), ou un milieu MRS ajusté à un pH supérieur à 7,0 (Schillinger et Holzapfel, 1990) permettent d'obtenir une biomasse importante des carnobactéries. Ainsi, il n'y a pas d'effet inhibiteur de l'acétate à pH 7,0. Les carnobactéries sont des lactobacilles non aciduriques par leur incapacité à cultiver à un pH inférieur à 5,0 (Shaw et Harding, 1985) et par un pH optimum de croissance entre 8 et 9 (Schillinger et Holzapfel, 1990). Le pH final d'une culture sur MRS sans acétate se situe entre 5,0 et 5,3 après 4 jours d'incubation (Holzapfel et Gerber, 1983).

Une étude physiologique récente (Mauguin *et al.*, 1993) a été réalisée sur plusieurs souches de *Carnobacterium* isolées de poisson. La croissance sur milieu APT est observée entre 5°C et 40°C et elle est optimale à des températures comprises entre 25°C et 35°C, selon les isolats. Pour chaque isolat, la concentration cellulaire en fin de croissance n'est pas ou peu modifiée pour des températures d'incubation comprises entre 20°C et 30°C, mais à partir de 15°C, elle décroît avec la température. Néanmoins, ces isolats peuvent se développer aux températures de réfrigération avec des taux de croissance de 0,1 h⁻¹ contre 0,9 h⁻¹ à 1,2 h⁻¹ à la température optimale. Le pH initial optimal de croissance en bouillon APT contenant 5g/l de glucose, incubé à 20°C, est d'environ 6,8 pour les différents isolats testés. Aucune croissance n'est décelée à un pH initial de 5,5. La présence de 3% de NaCl n'a pas d'effet sur la croissance des carnobactéries.

Les carnobactéries, comme les lactobacilles, sont dépourvues d'oxydase et de catalase. Elles ne réduisent pas les nitrates en nitrites par l'absence de nitrate-réductase. Elles possèdent une arginine dihydrolase (ADH) qui est un caractère important pour les différencier des *Streptobacterium* (Groupe II) lorsque la production de CO₂ n'est que difficilement décelable.

1.3.2.3. Type fermentaire

Collins *et al.* (1987) classent les *Carnobacterium* comme des bactéries hétérofermentaires, bien qu'ayant un rapport acétate + éthanol sur lactate plus faible que celui des lactobacilles hétérofermentaires stricts. Ces observations suggèrent à ces auteurs une voie d'utilisation du glucose différente de la voie de l'hétérofermentation stricte du 6-phosphogluconate (Kandler, 1983) et l'existence d'un métabolisme hétérofermentaire atypique. Collins *et al.* (1987) précisent que la production de CO₂ est souvent non détectable et qu'elle varie en fonction du substrat. Ainsi, *C. piscicola* souche B270 (Hiu *et al.*, 1984) produit du CO₂ à partir du glucose sur un milieu MRS additionné d'arginine.

Les travaux de De Bruyn *et al.* (1988) indiquent un métabolisme homofermentaire pour *C. divergens* DSM 20623, souche type du genre, produisant uniquement de l'acide lactique L(+) à partir du glucose par la voie de la glycolyse. Mais lorsque la source carbonée est en concentration limitante, de l'acide formique ainsi qu'un dégagement de CO₂ sont observés : le pyruvate est dégradé en formiate par la pyruvate formiate lyase et est décarboxylé en acétyl CoA par la pyruvate décarboxylase, produisant du CO₂ et aboutissant à de l'acétate (Fig. 1). Ces mêmes observations avaient conduit Holzapfel et Gerber (1983) à décrire la souche comme étant hétérofermentaire. Pour des carnobactéries isolées de poissons marins, Mauguin *et al.* (1993) ont récemment montré que dans le milieu APT contenant 5g/l de glucose, chaque mole de glucose consommée est convertie en une mole d'acide lactique. Cette fermentation apparemment hétérofermentaire n'est pas confirmée car le taux d'acide acétique reste faible en fin de croissance (inférieur à 0,5 g/l) et ainsi que la quantité d'éthanol qui reste inférieure à la limite de détection. En outre, Mauguin *et al.* (1993) notent la présence d'acide formique. Ainsi, ces isolats ont un métabolisme homofermentaire mais ils peuvent emprunter des voies secondaires au niveau du pyruvate (De Bruyn *et al.*, 1988). En milieu APT ne contenant que 0,5 g/l de glucose, l'acide formique est alors le principal métabolite produit (Mauguin *et al.*, 1993), accompagné par une faible quantité d'acide lactique. Tout se passe comme si le glucose présent en faible quantité était entièrement converti en acide formique (Fig. 1).

Pour les espèces récemment décrites *C. funditum* et *C. alterfunditum* (Franzmann *et al.*, 1991), le principal métabolite obtenu à partir du glucose est l'acide lactique L(+). Cette fermentation apparaît donc être principalement homofermentaire. Mais la présence d'acétate, de formiate et d'éthanol ainsi que la fermentation du ribose, un pentose, conduisent les auteurs à présenter ces deux souches comme des hétérofermentaires.

Il apparaît nécessaire de poursuivre les travaux sur les voies fermentaires précises des carnobactéries, afin de résoudre un certain nombre de contradictions de la littérature.

1.3.2.4. Chimio-taxonomie

Le genre *Carnobacterium* est caractérisé par un contenu en Guanine + Cytosine de 33,0 à 37,2 pour 100 moles d'ADN (Collins *et al.*, 1987). Le peptidoglycane de la paroi cellulaire contient de l'acide *meso*-diaminopimélique (*meso*-DAP). La majorité des acides gras cellulaires sont de type saturé ou monoinsaturé. A la différence des lactobacilles, il n'y a pas d'acide lactobacillique (C19:0) sauf chez *C. divergens* DSM 20623 (Collins *et al.*, 1987) et l'isomère majoritaire en C18:1 est l'acide oléique ($\Delta 9:10$) (Collins *et al.*, 1987) contre l'acide *cis*-vaccénique ($\Delta 11:12$) pour les lactobacilles.

1.3.2.5. Habitat

D'après leur nom, l'habitat habituel des espèces du genre *Carnobacterium* est la viande (emballée sous vide et réfrigérée). Plusieurs facteurs expliquent cette prédominance. Dans les viandes fraîches, l'arginine est le deuxième substrat énergétique après le glucose (Gill, 1976). Or, l'arginine est un acide aminé métabolisé par la voie de l'arginine désaminase, seulement par certaines espèces de bactéries lactiques, en général par les hétérofermentaires stricts, et aussi par les carnobactéries. Cette activité est conditionnée par une faible concentration en glucose (0,05%). Les conditions de conservation des viandes fraîches sous-vide et à des températures de réfrigération créent un environnement favorable pour les carnobactéries. Lorsque la concentration en glucose devient inférieure à 0,05%, les carnobactéries peuvent dégrader l'arginine et donc devenir une flore dominante (Montel *et al.*, 1991).

Différents isolats identifiés à *C. piscicola* proviennent de viandes émincées de boeuf, porc et mouton, réfrigérées et conservées sous-vide (Hitchener *et al.*, 1982 ; Shaw et Harding, 1984 ; Schillinger et Lücke, 1987) ou encore de viande de porc conservée sous atmosphère enrichie en CO₂ (Borch et Molin, 1988). Quelques micro-organismes identifiés à *C. piscicola* sont isolés de truites saumonées malades (Hiu *et al.*, 1984), qui présentent des lésions et des oedèmes sur et sous la peau. Selon, Hiu *et al.* (1984), seule l'espèce *C. piscicola* mais aucun *Lactobacillus* n'est responsable de la

septicémie ou lactobacillose des saumons et d'autres poissons. Les isolats identifiés à *C. divergens* proviennent de viande de boeuf émincée, emballée crue sous vide (Holzapfel et Gerber, 1983). Les espèces *C. mobile* et *C. gallinarum* sont isolées respectivement de viande de poulet irradiée et de morceaux de carcasses de poulet (Collins *et al.*, 1987). *C. funditum* et *C. alterfunditum*, récemment décrits (Franzmann *et al.* 1991), sont isolés des eaux profondes (24 mètres de profondeur) d'un lac salé de l'Antarctique. Environ neuf mois par an, une couverture de glace recouvre toute la surface du lac et empêche le transfert de l'oxygène vers les profondeurs. Toute l'année, la température est d'environ 1°C à 2°C, le pH de 6,6. Ainsi, la présence du genre *Carnobacterium* dans l'écosystème marin n'est donc pas uniquement associée à la notion de contamination d'animaux marins.

1.3.3. IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE *CARNOBACTERIUM*

L'identification d'isolats provenant de produits carnés (viande, poisson) anciennement nommés lactobacilles atypiques, puis récemment regroupés dans le genre *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987) repose sur des caractérisations phénotypique, chimiotaxonomique et génétique.

1.3.3.1. Caractères phénotypiques et chimiotaxonomiques

Les lactobacilles d'origine laitière ont une identification relativement aisée (Kandler et Weiss, 1986). En revanche, les lactobacilles des produits carnés présentent des caractères phénotypiques et chimiotaxonomiques spécifiques d'où la proposition de nouvelles espèces, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sake* (Schillinger et Lücke, 1987), *Lb. farciminis*, *Lb. alimentarius* et *Lb. viridescens* (Reuter, 1983), voire de nouveaux genres, comme *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987). Schillinger et Lücke (1987), puis Montel *et al.* (1991) proposent des clés d'identification facilitant leurs études.

L'identification des carnobactéries repose sur des caractères phénotypiques et chimiotaxonomiques plus ou moins discriminants du genre *Lactobacillus*. Le tableau 1 propose quelques uns de ces caractères.

Tableau 1 : Caractères discriminants pour différencier les carnobactéries des lactobacilles (D'après Hammes *et al.*, 1992)

CARACTERISTIQUES	<i>LACTOBACILLUS</i>	<i>CARNOBACTERIUM</i>
croissance sur acétate agar, (pH 5.4)	+	-
croissance à pH 4.5	+	-
croissance à pH 9.0	-	+
isomères d'acide lactique	L(+), D(-), DL	L(+)
type d'acide diaminopimélique dans le peptidoglycane	Lys, <i>meso</i> -DAP	<i>meso</i> -DAP
principal acide gras en C18	acide cis-vaccénique	acide oléique
fermentation (glucose)	homofermentaire hétérofermentaire	homofermentaire atypique
contenu en GC (% mole)	32-55	33.0-37.2

Pour un bâtonnet à Gram positif, dépourvu de catalase, d'oxydase et de nitrate réductase, il est identifié au genre *Carnobacterium* et non au genre *Lactobacillus* par l'association des caractères suivants : production d'acide lactique de type L(+), non dégradation du sorbitol, hydrolyse de l'arginine par la présence d'une arginine dihydrolase (ADH) et présence d'acide *meso*-diaminopimélique dans la paroi. Les réponses à ces quatre caractères, en combinaison différente, peuvent correspondre à certaines espèces du genre *Lactobacillus*.

La figure 1 propose une clé d'identification des 4 espèces du genre *Carnobacterium* retenues par Collins *et al.* (1987), les 2 autres espèces *C. funditum* et *C. alterfunditum* (Franzmann *et al.*, 1991) n'étant pas connues avec précision.

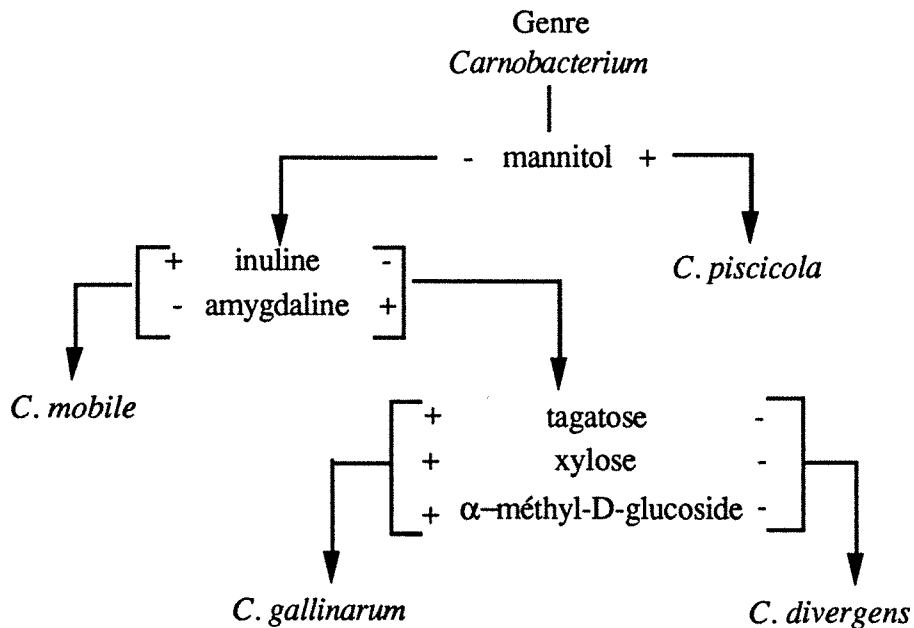


Figure 2 : Clé d'identification de 4 espèces du genre *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987 ; Schillinger et Lücke, 1987 ; Montel *et al.*, 1991 et travaux de Millière *et al.*, 1994, au laboratoire)

1.3.3.2. Caractères génotypiques

L'identification des bactéries lactiques, reposant sur un grand nombre de tests phénotypiques, est une étude fastidieuse et qui n'aboutit pas toujours à des résultats concluants. C'est le cas des bactéries appartenant au genre *Carnobacterium*. Ainsi, une identification fondée sur des tests génotypiques peut fournir des résultats plus discriminants, stables et permettre la réalisation d'arbre phylogénétique.

L'identification d'un isolat grâce à ses caractères génotypiques consiste en une hybridation entre le support génétique de la souche à identifier et une sonde dont la spécificité varie selon l'identification à réaliser. Une condition à respecter est d'avoir suffisamment de matériel génétique de la souche à identifier. Le recours à une technique appelée PCR (Polymerase Chain Reaction) ou réaction de polymérisation en chaîne est destinée à amplifier le support génétique de la souche à identifier pour augmenter la spécificité et la sensibilité de l'hybridation avec des sondes. C'est une méthode rapide,

spécifique, simple et sensible. La PCR nécessite la présence de deux amorces (primers) qui correspondent chacune à une séquence de l'ARN 16S. L'analyse de cette séquence est en effet une approche rapide et puissante pour élucider la relation naturelle entre les micro-organismes (Lane *et al.*, 1985) grâce à la présence de régions restées inchangées qui sont des séquences universelles et d'autres ayant varié si rapidement qu'elles peuvent être employées pour différencier les espèces (Grimont et Grimont, 1986).

Dans le cas des carnobactéries, Brooks *et al.* (1992) emploient deux amorces (primers) différentes : l'une dite semi-universelle, le primer Y, correspondant aux positions 287-306 selon le système de numérotation de l'ARN 16S chez *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978), l'autre spécifique des carnobactéries, le primer n°102, qui correspond à la séquence de l'ARN 16S déterminée par Wallbanks *et al.* (1990) pour le genre *Carnobacterium*. Ces deux amorces sont utilisées pour amplifier les régions de l'ADN ribosomique à partir d'ADN de niveaux de pureté différents : ADN purifié, extraits cellulaires ou colonies isolées. Les produits de la PCR sont alors visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ils sont ensuite identifiés au niveau de l'espèce par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques correspondant à la séquence de l'ARN 16S, spécifique aux différentes espèces du genre *Carnobacterium* (Wallbanks *et al.*, 1990).

Brooks *et al.* (1992) montrent que sans aucune purification de l'ADN, à partir de colonies isolées, l'amplification permet de diminuer le seuil de détection de l'ADN bactérien, puisque d'une numération de 1.10^6 ufc.ml⁻¹, il passe à moins de 10 ufc.ml⁻¹. D'ailleurs, aucune hybridation avec une sonde n'est détectée sans l'utilisation de la technique de PCR, quel que soit le matériel de départ, ADN purifié, extraits cellulaires ou colonies isolées.

La souche UI49 isolée de poisson est également identifiée en se fondant sur l'analyse de la séquence de l'ARN 16S par PCR (Stoffels *et al.*, 1992a). Deux amorces de 18-mers et de 20-mers, correspondant respectivement aux positions 519-536 et 907-926, positions de l'ARN 16S d'*E. coli* (Lane *et al.*, 1985) sont utilisées. L'amplification par PCR des nucléotides de la position 516 à 926 donne un fragment de 410 nucléotides à partir duquel une séquence de 271 nucléotides est obtenue. La comparaison de la séquence de ce fragment de 271 nucléotides de l'ARN 16S, obtenu à partir de la souche UI49, avec des séquences connues d'ARN 16S de différentes bactéries lactiques révèle une forte homologie avec les séquences de l'ARN 16S des carnobactéries. Une homologie avec l'espèce *C. piscicola* de 95,6%, contre 93,7% avec *C. divergens*, 94,8% avec *C. gallinarum*

et 93,4% avec *C. mobile* permet d'identifier la souche UI49, issue de poisson frais, à *C. piscicola*.

Pour l'identification d'un isolat, issu d'un lac glacé de l'Antarctique, Franzmann *et al.* (1991) ont également recours à l'analyse de l'ARN 16S. Pour cela, ils amplifient par PCR l'ADN chromosomique de leur souche pf3, ce qui leur permet d'obtenir deux fragments d'ADN codant pour le gène de l'ARN 16S. La comparaison de la séquence de l'ARN 16S de la souche pf3 avec celles publiées pour les différentes souches de référence du genre *Carnobacterium* (Wallbanks *et al.*, 1990) montre que la souche pf3 a une homologie importante avec l'espèce *C. mobile*. Cependant, un pourcentage d'homologie ADN/ADN faible avec cette même espèce a conduit les auteurs à créer une nouvelle espèce au sein du genre *Carnobacterium* : *C. funditum* (Franzmann *et al.*, 1991), ainsi que l'espèce *C. alterfunditum*, qui se différencie de la précédente par une modification du profil d'utilisation des différents glucides.

CHAPITRE 2

2. LES BACTERIOCINES DES BACTERIES LACTIQUES

La présence des bactéries lactiques dans les produits alimentaires fermentés permet le catabolisme de différents hydrates de carbone en acides organiques (acide lactique, acide acétique). Comme ces acides faibles sont des métabolites finaux non ultérieurement métabolisés par la cellule productrice, ils sont excrétés, induisant une diminution de pH du milieu extérieur. En conditions acides, la forme non dissociée de ces acides ralentit ou inhibe la croissance de la flore contaminante endogène, indésirable et des éventuelles bactéries pathogènes.

Lors d'un processus fermentaire, les bactéries lactiques établissent entre elles des interactions positives ou négatives, toutes deux directement liées aux métabolites produits lors de la croissance (Juillard *et al.*, 1987). Outre les acides faibles, les bactéries lactiques produisent des composés antimicrobiens tels que éthanol, diacétyl, peroxyde d'hydrogène et pour quelques unes d'entre elles des bactériocines. Chacun de ces composés, par la modification des conditions physico-chimiques initiales du milieu, contribue aux qualités organoleptiques et texturales du produit fermenté, mais aussi à sa meilleure conservation. Cependant, lors d'une fermentation naturelle non dirigée, la croissance des micro-organismes souhaités peut être plus ou moins entravée, conduisant alors à la prolifération de micro-organismes indésirables, comme les bactéries pathogènes mais aussi à des modifications non souhaitées en fabrication industrielle. Pour atténuer ces inconvénients, la plupart des produits fermentés sont maintenant obtenus par fermentation contrôlée. Dans ce cas, des ferments ou levains sélectionnés sont ajoutés au matériel cru et incubés dans des conditions qui stimulent leur croissance et donc la production des métabolites désirés. Dans le cas des souches ayant la propriété d'élaborer des bactériocines, une utilisation intéressante serait de les incorporer dans les ferments mixtes afin d'inhiber les micro-organismes indésirables, sans qu'elles inhibent les autres ferments.

2.1 QU'EST CE QU'UNE BACTERIOCINE ?

Les premières bactériocines étudiées furent celles produites par des bactéries à Gram négatif, dont *Escherichia coli* producteur des colicines (Konisky, 1982). Les recherches actuelles concernent aussi les bactériocines des bactéries à Gram positif. Tagg *et al.* (1976) rassemblent les critères de définition d'une bactériocine en se fondant principalement sur les caractéristiques des protéines de type colicine :

- ⇒ spectre d'activité centré sur les espèces taxonomiquement proches de la souche productrice
- ⇒ présence d'une fraction protéique biologiquement active
- ⇒ mode d'action bactéricide
- ⇒ adsorption sur les cellules cibles par la présence de récepteurs spécifiques
- ⇒ support génétique de production et de résistance à la bactériocine de nature plasmidique

Suite aux nombreux travaux sur la mise en évidence et la caractérisation de nouvelles bactériocines de bactéries à Gram positif, ces critères de définition ne sont plus toujours adaptés. Ainsi, le spectre d'activité des bactériocines des bactéries lactiques est rarement limité aux espèces apparentées mais s'étend vers d'autres genres bactériens, sans cependant inhiber les bactéries à Gram négatif.

En se fondant sur la littérature concernant l'étude des bactériocines, il est cependant possible de préciser leurs caractéristiques générales communes.

⇒ Nature chimique : ces protéines antibactériennes sont souvent hydrophobes, elles sont caractérisées par la présence de nombreux acides aminés basiques et sont souvent présentes sous forme d'agrégats. En outre, certaines peuvent contenir des acides aminés inhabituels tels les lanthionines, β -méthyllanthionines et les résidus déshydratés (Fig.3).

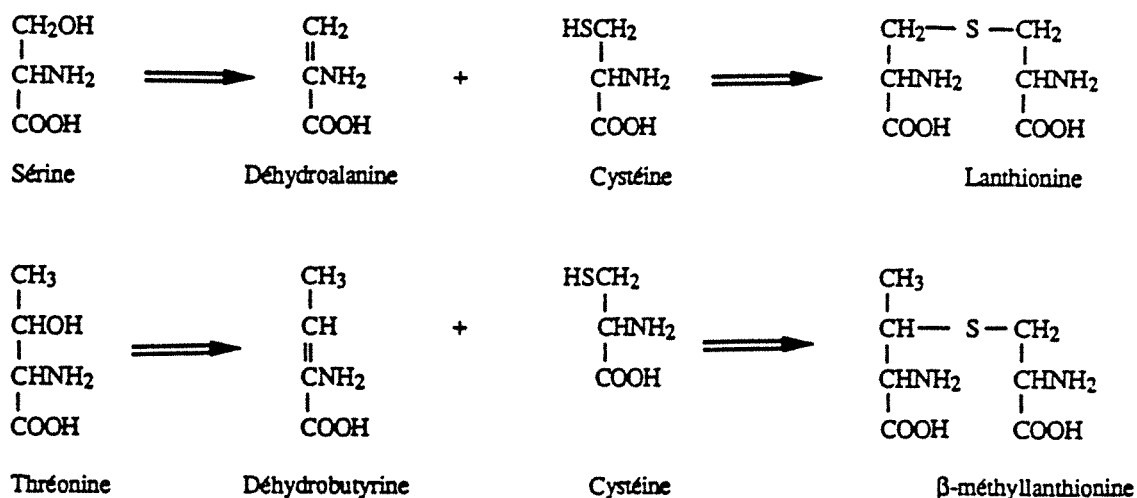


Figure 3 : Voie de synthèse de résidus lanthionine et β -méthyllanthionine (d'après Ingram, 1969)

\Rightarrow Synthèse : quelques bactériocines pourraient être produites pendant la phase stationnaire de croissance de la souche productrice. Ce serait le cas de la nisine (Hurst, 1981), de la pédiocine AcH (Biswas *et al.*, 1991) ou encore de la lacticine 481 (Piard *et al.*, 1990). Cependant la plupart sont produites pendant la phase exponentielle de croissance de la souche productrice, comme la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a), la leucocine A (Hastings *et al.*, 1991) ou l'helvéticine V-1829 (Vaughan *et al.*, 1992). La synthèse d'une bactériocine peut inclure des modifications post-traductionnelles avec la formation des lanthionines, des β -méthyllanthionines et des résidus déshydratés comme c'est le cas pour la nisine (Kaletta et Entian, 1989) et en général pour tous les autres lantibiotiques connus : la lacticine 481 (Piard *et al.*, 1992), la lactococcine (Dufour *et al.*, 1991), la lactocine S (Mortvedt *et al.*, 1991) et la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992b).

\Rightarrow Déterminants génétiques : selon la définition de Tagg *et al.* (1976) les gènes de production des bactériocines sont localisés sur un plasmide. Mais la connaissance des déterminants génétiques de diverses bactériocines de bactéries lactiques montre que la localisation peut être plasmidique comme pour la pédiocine AcH (Ray *et al.*, 1989), la leucocine A (Hastings *et al.*, 1991), la lactocine S (Mortvedt et Nes, 1990) la sakacine A

(Holck *et al.*, 1992) et l'acidocine 8912 (Kanatani *et al.*, 1992) mais également chromosomique pour la lactacine B (Barefoot et Klaenhammer, 1983), l'helvéticine V-1829 (Vaughan *et al.*, 1992) et l'helvéticine J (Joerger et Klaenhammer, 1986), ou encore sur un transposon dans le cas de la nisine (Steen *et al.*, 1991).

⇒ Mode d'action : certaines bactériocines peuvent être bactéricides. Il y a mort de la cellule cible qui se traduit par une diminution du nombre de cellules viables par rapport à l'inoculum initial. C'est le cas de la plantaricine BN, la bavaricine MN (Lewus et Montville, 1992), la pédiocine PA-1 (Pucci *et al.*, 1988), la pédiocine AcH (Bhunja *et al.*, 1991), la mésentéricine Y105 (Hécharde *et al.*, 1992b), ces trois dernières étant anti-*Listeria*. Parmi les bactériocines à effet bactéricide, certaines lysent les cellules mortes, c'est un effet bactériolytique qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 660 nm. C'est le cas de la curvacine A et de la sakacine P (Tichaczek *et al.*, 1992) de la mésentéroïne FR52 (Mathieu *et al.*, 1993a). D'autres bactériocines sont bactériostatiques, les cellules cibles restent à leur taux initial d'inoculation : il n'y a ni croissance, ni mortalité. C'est le cas pour la mésentéroïne 5 (Daba *et al.*, 1991) et la leuconocine S (Lewus *et al.*, 1992).

Le mécanisme d'action des bactériocines est peu connu. L'adsorption de la bactériocine peut être observée sur des sites spécifiques aussi bien localisés sur une souche sensible que sur une souche résistante. Dans le cas d'une souche sensible seulement, il y a déstabilisation des fonctions membranaires. C'est ainsi que la nisine affecte le potentiel de membrane, les flux d'ions et inhibe le transport des acides aminés (Ruhr et Sahl, 1985 ; Gao *et al.*, 1991). La pédiocine AcH entraîne une fuite d'ion K^+ due à l'augmentation de la perméabilité membranaire. La mésentéricine Y105 possède une action dépolarisante sur la membrane des cellules sensibles, entraînant un efflux rapide d'acides aminés, inhibe la synthèse d'ATP et la translocation d'ADP (Maftah *et al.*, 1993).

⇒ Spectre d'activité : au sein des bactéries à Gram positif, une bactériocine peut inhiber la croissance de souches appartenant à la même espèce, au même genre ou encore à des genres différents. Les bactéries à Gram négatif ne sont pas inhibées, en général, par ces bactériocines. Cependant, Stevens *et al.* (1991) mentionnent la sensibilité vis-à-vis de la nisine de bactéries à Gram négatif incluant les genres *Salmonella*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, et l'espèce *Escherichia coli* après différents traitements tels que congélation, chauffage, acidification, présence d'EDTA. Cette sensibilité des bactéries à Gram négatif est une conséquence des dommages occasionnés à la paroi qui permet alors à la nisine d'entrer en contact avec la membrane plasmique et donc de déstabiliser ses fonctions.

⇒ Stabilité : l'activité antibactérienne est retenue après un traitement thermique variant de quelques minutes à plusieurs heures sur une gamme de températures de 80°C à 121°C. L'activité antibactérienne est stable sur une large gamme de pH mais en général une plus grande stabilité est notée à pH acide. La plupart des bactériocines conservent une activité après une conservation de plusieurs mois à -20°C, à +4°C et après lyophilisation. Ces résultats sont surtout observés sur des extraits bruts.

⇒ Enzymes protéolytiques : l'activité antibactérienne est détruite par l'ensemble des enzymes protéolytiques, incluant les enzymes gastriques et intestinales (pepsine, α -chymotrypsine, trypsine). Cependant, l'action d'enzymes non protéolytiques peut être observée sur certaines bactériocines dans les extraits bruts. La brevicine SB27 (Benoit *et al.*, 1994), la mésentérocline FR52 (Sudirman *et al.*, 1994) sont sensibles dans les extraits bruts à la phospholipase A2 (Sigma).

⇒ Toxicité : pour seulement deux bactériocines, la nisine et la pédiocine AcH, ces tests ont été effectués officiellement. Ces bactériocines ont été déclarées non toxiques pour les animaux soit après injection, soit après absorption (aliment).

Parmi ces caractéristiques, certaines dont le spectre antibactérien, la stabilité à la chaleur et au pH, la digestion par des enzymes protéolytiques, permettent d'avancer une forte présomption de la présence d'une bactériocine comme agent inhibiteur. De plus, la connaissance de ces caractéristiques doit permettre, lors de l'étude d'une nouvelle bactériocine, de vérifier rapidement si elle est réellement différente d'une autre par comparaison de ses propriétés.

2.2. NOMENCLATURE DES BACTERIOCINES

La nomenclature des bactériocines des bactéries lactiques est encore arbitraire. Le nom donné est subjectif et propre à chaque auteur, sans règle précise. Si les suffixes "ine" ou "cine" sont toujours présents dans ce nom, celui-ci peut être fondé sur l'espèce bactérienne de la souche productrice. Ainsi, la bavaricine est produite par *Lactobacillus bavaricus* (Larsen *et al.*, 1993), la plantaricine par *Lb. plantarum* (Jimenez-Diaz *et al.*, 1990), l'helvéticine par *Lb. helveticus* (Vaughan *et al.*, 1992). Quelquefois, le nom de genre

en entier ou tronqué est retrouvé comme racine du nom donné à une bactériocine. C'est le cas des lactococcines produites par les bactéries du genre *Lactococcus* ou celui des pédiocines pour le genre *Pediococcus*. Au sein du genre *Carnobacterium*, il est possible de les trouver sous les termes de carnocine (Stoffels *et al.*, 1992a) ou de carnobactériocine (Worobo *et al.*, 1993 ; Quadri *et al.*, 1993). Il arrive aussi que des bactériocines produites par la même espèce bactérienne ou le même genre bactérien aient des noms différents, reposant soit sur l'espèce, soit sur le genre. Ainsi, *Lb. sake* peut produire des sakacines (Schillinger et Lücke, 1989 ; Sobrino *et al.*, 1991 ; Tichaczek *et al.*, 1992) ou encore une lactocine (Mortvedt et Nes, 1990). De même au sein du genre *Leuconostoc*, sont signalées la leucocine (Hastings *et al.*, 1991), la leuconocine (Lewus *et al.*, 1991) mais aussi la mésentéricine (Hécharde *et al.*, 1992a), la mésentérocine (Mathieu *et al.*, 1993a) ou encore la carnosine produite par *Ln. carnosum* (Van Laack *et al.*, 1992). Enfin, il ne faut pas confondre les lactocines (F ou B) produites par *Lb. acidophilus* (Muriana et Klaenhammer, 1991 ; Barefoot et Klaenhammer, 1984) avec la lactocine produite par *Lb. helveticus* (Upreti et Hinsdill, 1975). Dans l'avenir, il serait nécessaire de définir des règles précises et d'harmoniser la nomenclature des bactériocines.

2.3. LES BACTERIOCINES, DE NOUVEAUX AGENTS DE CONSERVATION ?

Actuellement dans les pays développés les consommateurs s'intéressent aux aspects nutritionnels qualitatifs des aliments. Ils sont sensibilisés aux effets néfastes sur la santé des taux élevés en acides gras, en cholestérol et en sodium et d'un rapport énergétique trop important. Ils associent l'aliment avec la notion de bien-être. De ce fait, ils sont attirés par des aliments naturels, frais et sains, contenant peu d'agents conservateurs d'origine chimique, suspectés de pouvoir entraîner des effets indésirables à forte concentration (nitrites, sulfites). Pour répondre à toutes ces exigences, une nouvelle gamme de produits alimentaires est proposée : elle comporte des aliments contenant peu ou pas de conservateurs, emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée, réfrigérés pour allonger la date limite de vente du produit. Cependant ces nouveaux modes de conservation ne seraient pas toujours sans risque notamment en cas d'interruption de la chaîne du froid.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques pourraient offrir un moyen naturel pour contrôler les contaminations bactériennes indésirables dues à *Listeria* ou à *Clostridium*, pathogènes ou toxigènes. Ainsi, l'addition d'une bactériocine dans une chaîne de fabrication pourrait amener à réduire (ou supprimer) l'incorporation de

conservateurs chimiques tout en assurant un contrôle efficace de la flore contaminante (Marugg, 1991).

Deux types d'utilisation d'une bactériocine en tant qu'agent de conservation sont à envisager : utiliser la molécule pure ou inclure la souche productrice de la bactériocine dans les mélanges de "ferments lactiques" quand il existe une étape de fermentation lactique lors de l'élaboration de l'aliment. Des bactériocines sont produites par certaines bactéries lactiques isolées de produits fermentés. Des bactériocines se trouveraient donc naturellement dans certains de ces produits. L'addition de la molécule pure dans un produit ne devrait donc pas poser de risque pour le consommateur. Cependant, actuellement seule la nisine a le statut de molécule GRAS (Generally Recognized As Safe) reconnu par la Food and Drug Administration depuis 1988 (FDA, 1988). La nisine est bactéricide pour les cellules végétatives des bactéries à Gram positif sensibles. Chaque pays a sa réglementation pour l'utiliser en quantités définies et dans des produits précis. En France, son utilisation reste limitée aux fromages fondus. Deux autres bactériocines, la pédiocine AcH (Ray, 1992) et la pédiocine PA-1 (Chikindas *et al.*, 1993), sont, en ce moment testées pour leur effet bactéricide dans différents produits alimentaires, produits laitiers et produits carnés, aux Etats-Unis.

L'utilisation de la souche productrice semble être pour le moment la solution la moins contraignante du point de vue légal. Cependant il faut s'assurer de la compatibilité de la souche avec le produit fermenté, pour ne pas entraîner de modifications organoleptiques.

L'utilisation des bactériocines comme conservateurs alimentaires a cependant des limites. La première concerne le mode d'action de la bactériocine. En effet, au sein d'une population sensible à la bactériocine, il a été démontré la présence d'une sous population résistante à cette bactériocine (Harris *et al.*, 1991 ; Mathieu *et al.*, 1994 ; Rekhif *et al.*, 1994). Or comme une bactériocine, n'a pas toujours une action bactériostatique, ces résistants peuvent se multiplier. C'est pourquoi s'impose une nécessité de travailler avec une matière première ayant, au départ, un faible taux de contaminants et d'éviter l'apport de nouveaux contaminants par le maintien de conditions sanitaires rigoureuses. Dans de telles conditions, l'addition d'une bactériocine ayant une action bactéricide contre certains contaminants en réduira le nombre et la croissance d'éventuels résistants ne se ferait que tardivement. La seconde limite est liée au spectre d'action des bactériocines quelquefois large et il s'avère indispensable que les micro-organismes nécessaires à la fabrication de l'aliment ne soient pas inhibés par la bactériocine.

2.4. LES BACTERIOCINES ANTI-LISTERIA

Le genre *Listeria* est très répandu dans l'environnement et peut être isolé d'échantillons de sol, d'ensilage, d'eau, de végétaux pourrissants, d'engrais, d'insectes et de plus de cinquante espèces d'animaux. Ce genre regroupant des cellules en forme de bâtonnet, à Gram positif, psychrotrophes, phylogénétiquement proche des bactéries lactiques, est l'agent responsable de la listériose (Farber et Peterkin, 1991) ; la principale source de contamination est d'origine alimentaire. Cette maladie peut provoquer des septicémies et méningites principalement chez des personnes ayant des défenses immunitaires affaiblies, notamment chez les personnes âgées, les femmes enceintes et leur foetus. Inoculées par voie orale, les listeria traversent la barrière intestinale et l'infection cellulaire se propage par un mécanisme maintenant connu (Cossart et Mengaud, 1989).

Certaines bactériocines des bactéries lactiques peuvent être un moyen pour limiter la prolifération des *Listeria* dans les produits alimentaires. Ces bactériocines sont produites par différents genres bactériens : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* et *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Le tableau 2 présente ces différentes bactériocines.

Tableau 2 : Bactériocines anti-*Listeria* produites par les bactéries lactiques

Bactériocine	Origine	Séquence en acides aminés	Mode d'action	Déterminant génétique	Références
nisine	<i>Lc. lactis lactis</i> ATCC11454	oui	bactéricide	transposon	Hurst, 1981 ; Ruhr et Sahl., 1985
pédiocine A	<i>P. pentosaceus</i>	non	n.d	plasmide	Daeschel et Klaenhammer, 1985
pédiocine AcH	<i>P. acidilactici</i> H	oui	bactéricide	plasmide de 11.4 kb	Bhunja <i>et al.</i> , 1988
pédiocine PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	oui	bactéricide	plasmide de 9.4 kb	Henderson <i>et al.</i> , 1992
25 pédiocine	<i>P. acidilactici</i> PC	non	n.d	plasmide de 8.47 kb	Jager et Harlander, 1992
sakacine A	<i>Lb. sake</i> Lb706	oui	n.d	plasmide de 60kb	Holck <i>et al.</i> , 1992 ; Axelsson <i>et al.</i> , 1993
sakacine P	<i>Lb. sake</i> LTH673	oui	bactériolytique	n.d	Tichaczek <i>et al.</i> , 1992
curvacine A	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	partielle	bactériolytique	n.d	Tichaczek <i>et al.</i> , 1992
curvaticine SB13	<i>Lb. curvatus</i> SB13	en cours	bactéricide	n.d	Sudirman <i>et al.</i> , 1993
leucocine A-UAL187	<i>Ln. gelidum</i> UAL-187	oui	bactériostatique	plasmide de 11.7 kb	Hastings <i>et al.</i> , 1991
mésentérocin 5	<i>Ln. mesenteroides</i> 5	non	bactériostatique	n.d	Daba <i>et al.</i> , 1991
leuconocine S	<i>Ln. paramesenteroides</i> OX	non	bactériostatique	n.d	Lewus <i>et al.</i> , 1992
carnosin	<i>Ln. carnosum</i> LA44A	non	n.d	n.d	Van Laack <i>et al.</i> , 1992

mésentéricine Y105	<i>Ln. mesenteroides</i> Y105	oui	bactéricide	plasmide de 25 kb	Hécharde <i>et al.</i> , 1992a Hécharde <i>et al.</i> , 1992b
mésentéroïne FR52	<i>Ln. mesenteroides</i> FR52	en cours	bactéricide	n.d	Mathieu <i>et al.</i> , 1993a Sudirman <i>et al.</i> , 1994
bavaricine A	<i>Lb. bavaricus</i> MI 401	oui	bactéricide	n.d	Larsen <i>et al.</i> , 1993
plantaricine C19	<i>Lb. plantarum</i> C19	oui	bactériostatique	n.d	Atrih <i>et al.</i> , 1993a Atrih <i>et al.</i> , 1993b
carnobactériocine B2	<i>C. piscicola</i> LV17B	oui	n.d	plasmide de 40MDa	Quadri <i>et al.</i> , 1993
carnobactériocine BM1	<i>C. piscicola</i> LV17B	oui	n.d	chromosome	Quadri <i>et al.</i> , 1993
sans nom	<i>C. piscicola</i> LK5	non	bactériostatique	n.d	Buchanan et Klawitter, 1992
carnocine CP5	<i>C. piscicola</i> CP5	partielle	bactériolytique	n.d	Mathieu <i>et al.</i> , 1993b

n.d : non déterminé

CHAPITRE 3

3. LES BACTERIOCINES PRODUITES PAR LES BACTERIES DU GENRE CARNOBACTERIUM

Le genre *Carnobacterium* décrit en 1987 (Collins *et al.*, 1987) regroupe des bactéries précédemment classées comme des lactobacilles dits "atypiques", parce qu'ils sont non aciduriques et psychrotrophes. En 1990, deux équipes, l'une canadienne (Ahn et Stiles, 1990a), l'autre allemande (Schillinger et Holzapfel, 1990), mentionnent, pour la première fois, au sein de ce genre la production de bactériocine par respectivement *C. piscicola* LV17 et *C. piscicola* LV61, toutes deux isolées par Shaw et Harding (1984) de viande de boeuf réfrigérée, conditionnée sous vide. En 1991, Lewus *et al.* réalisent un criblage sur des bactéries lactiques et des bactéries apparentées isolées de morceaux de viande de boeuf, porc et agneau. Parmi dix isolats producteurs de bactériocine, deux sont identifiés à l'espèce *C. piscicola* (notés GN et DX), tous deux isolés de boeuf. En 1992, une équipe norvégienne (Stoffels *et al.*, 1992a) isole de poisson frais une souche *C. piscicola* UI49 productrice d'une bactériocine, la carnocine UI49, tandis qu'une équipe américaine (Buchanan et Klawitter, 1992a) isole une souche *C. piscicola* LK5 de viande de boeuf crue qui empêche le développement de *L. monocytogenes* dans l'échantillon. Dernièrement, une équipe française (Pilet *et al.*, 1993) signale ses travaux sur une bactériocine, la piscicocine V1, produite par *C. piscicola* V1 isolé de poisson fumé.

3.1. SPECTRE D'ACTIVITE

Le tableau 3 présente le spectre antibactérien des activités bactériocines connues produites par des carnobactéries. Toutes ces bactériocines ont une action contre d'autres espèces du genre *Carnobacterium* sauf pour les isolats *C. piscicola* LK5 (Buchanan et Klawitter, 1992a) et *C. piscicola* GN et DX (Lewus *et al.*, 1991) où le test n'a pas été fait. Mais aucune de ces bactériocines n'a un spectre limité à ce seul genre (spectre étroit selon Tagg *et al.*, 1976). Le genre *Pediococcus* est inhibé par les isolats *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990b), UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a) et V1 (Pilet *et al.*, 1993) tandis que le genre *Enterococcus* l'est par les isolats *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990b) et LV61 (Schillinger et Holzapfel, 1990). Au sein du genre *Lactobacillus*, les espèces d'origines carnées (*Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lb. viridescens*) sont souvent inhibées. A part l'isolat *C. piscicola* UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a) toutes ces bactériocines sont actives contre le genre *Listeria*.

Tableau 3 : Origine et spectre d'activité des bactériocines produites par des bactéries du genre *Carnobacterium*

Souche productrice	Origine	Spectre antibactérien	Références
<i>C. piscicola</i> LV17	viande fraîche conservée sous vide à 4°C	<i>C. divergens</i> LV13 ; <i>C. piscicola</i> UAL26 <i>Lb. sake</i> ATCC 15521 ; <i>Lb. viridescens</i> ATCC 12706 <i>Lb. sp.</i> UAL3 et UAL12 <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 ; <i>P. parvulus</i> ATCC 19371 <i>E. faecalis</i> ATCC 19433 ; <i>E. faecium</i> ATCC 11576 <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	Ahn et Stiles, 1990a Ahn et Stiles, 1990b
<i>C. piscicola</i> LV61	origine carnée	<i>C. divergens</i> L66 ; <i>C. piscicola</i> LV14 <i>E. faecalis</i> DSM 20380 et DSM 20477 <i>Lb. plantarum</i> DSM 20174 ; <i>Lb. sake</i> DSM 20017 <i>L. monocytogenes</i> DSM 20600	Schillinger et Holzapfel, 1990
<i>C. piscicola</i> GN <i>C. piscicola</i> DX	viande de boeuf,	<i>L. monocytogenes</i> Scott A, V7, 101m et 103 m <i>A. hydrophila</i> ATCC 7965 et K144	Lewus <i>et al.</i> , 1991
<i>C. piscicola</i> UI49	poisson frais	<i>C. divergens</i> NCDO 2306 et DSM 20623 ; <i>C. gallinarum</i> NCDO 2766 ; <i>C. mobile</i> NCDO 2765 ; <i>C. piscicola</i> DSM 20730 et DSM 20722 <i>Lb. acidophilus</i> (2/2), <i>Lb. amylophilus</i> (1/1) , <i>Lb. casei</i> (5/5), <i>Lb. curvatus</i> (2/3), <i>Lb. delbrueckii</i> (2/2), <i>Lb. reuteri</i> (1/1), <i>Lb. sake</i> (3/4), sauf <i>Lb. plantarum</i> (11/11) <i>Lactococcus lactis</i> (19/21), <i>Pediococcus</i> (4/12)	Stoffels <i>et al.</i> , 1992a
<i>C. piscicola</i> LK5	viande de boeuf	<i>L. monocytogenes</i> (9/11), <i>L. innocua</i> (2/4), <i>L. welshimeri</i> (3/3), <i>L. ivanovii</i> (2/2), <i>L. grayi</i> (1/1)	Buchanan et Klawitter, 1992a
<i>C. piscicola</i> CP5	fromage de type Brie	<i>Carnobacterium</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i>	Mathieu <i>et al.</i> , 1993b
<i>C. piscicola</i> V1	poisson fumé	<i>Carnobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Listeria</i>	Pilet <i>et al.</i> , 1993

Dans le cas de l'isolat *C. piscicola* LV61 (Schillinger et Holzapfel, 1990), l'inhibition n'est détectée que si le surnageant de culture est concentré dix fois. Il faut noter l'inhibition de la bactérie à Gram négatif *A. hydrophila* par les isolats *C. piscicola* GN et DX (Lewus *et al.*, 1991). Ce résultat inattendu peut être lié à la méthode de détection. En effet, c'est une culture des souches productrices qui est testée et non un surnageant de culture neutralisé.

3.2 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le tableau 4 regroupe les propriétés physico-chimiques des activités bactériocines des carnobactéries, décrites jusqu'à présent.

La plupart de ces bactériocines sont sensibles aux enzymes protéolytiques : trypsine, pronase E, α -chymotrypsine. En revanche la sensibilité à la pepsine est moins nette : la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a) a son activité partiellement réduite alors que l'activité des bactériocines produites par *C. piscicola* LK5 (Buchanan et Klawitter, 1992a) et LV17 (Ahn et Stiles, 1990b) est conservée à 100%. Cependant il faut signaler que dans la littérature le pH auquel l'incubation avec la pepsine est réalisée n'est pas toujours précisé, d'où des résultats quelquefois contradictoires. La protéase de type XIII, lorsqu'elle fait partie des enzymes protéolytiques testées, comme dans le cas des bactériocines produites par *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990b) et LV61 (Schillinger et Holzapfel, 1990) ne réduit ni ne détruit l'activité antibactérienne, indiquant donc une insensibilité de ces bactériocines à cette protéase. Les bactériocines des carnobactéries sont insensibles à des enzymes non protéolytiques (lipase, phospholipase, α -amylase).

Ces bactériocines supportent un traitement thermique de quelques minutes (5, 10, 30 minutes) à 100°C. Après un cycle d'autoclave de 15 minutes à 121°C, l'activité de la bactériocine produite par *C. piscicola* LV17 est réduite de 32 fois alors que celle de la carnocine UI49 reste intacte.

L'activité antibactérienne de ces bactériocines est stable sur une large gamme de pH, de 2.0 à 10.0. Cette caractéristique est intéressante en sachant que la souche productrice, elle, est non acidurique et que sa croissance cesse dès que le pH du milieu est de l'ordre de 5.5-5.0.

Le surnageant de culture de l'isolat *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990a) filtré sur un filtre Acrodisc (0.45 µm) conserve l'activité contre les deux souches cibles *C. divergens* LV13 et *Lb. viridescens* ATCC 12706. En revanche, ce même surnageant de culture filtré sur un filtre Millipore (0.45 µm) n'est plus actif contre *Lb. viridescens* ATCC 12706 mais exerce une activité uniquement sur *C. divergens* LV13. Les auteurs émettent alors les hypothèses soit que la souche LV17 produit deux bactériocines soit qu'il existe une grande différence de sensibilité entre les deux souches cibles vis-à-vis de la bactériocine.

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des bactériocines produites par des bactéries du genre *Carnobacterium*

Souche productrice	Sensibilité aux enzymes protéolytiques	Stabilité thermique Stabilité au pH	Référence
<i>C. piscicola</i> LV17	protéases de type I, IV, subtilisine (VIII), thermolysine (X), pronase E (XIV), papaïne (type IV) α-chymotrypsine, trypsine (type IX)	30 min. à 62°C 30 min. à 100°C 15 min. à 121°C pH 2.0 à 11.0	Ahn et Stiles, 1990b
<i>C. piscicola</i> LV61	trypsine	10 min. à 100°C pH 2.0 à 10.0	Schillinger et Holzapfel, 1990
<i>C. piscicola</i> GN <i>C. piscicola</i> DX	<u>pour GN</u> : protéase K, pronase E <u>pour DX</u> : α-chymotrypsine, protéase K, pronase E	n.d	Lewus <i>et al.</i> , 1991
<i>C. piscicola</i> UI49	trypsine (type II), codtrypsine α-chymotrypsine, pronase E	15 min. à 121°C pH 2.0 à 10.0	Stoffels <i>et al.</i> , 1992a
<i>C. piscicola</i> LK5	trypsine, papaïne, chymopapaïne	5 min. à 100°C	Buchanan et Klawitter, 1992a
<i>C. piscicola</i> CP5	pronase E, protéinase K, trypsin, α-chymotrypsine, pepsin, ficin, thermolysine	60 min à 100°C	Mathieu <i>et al.</i> , 1993b
<i>C. piscicola</i> V1	n.p	n.p	Pilet <i>et al.</i> , 1993

n.d : non déterminé ; n.p : non publié à notre connaissance

3.3 PRODUCTION DES BACTERIOCINES DES CARNOBACTERIES

Dans le cas de l'isolat *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990b) le milieu de production est le milieu APT ; la température est fixée à 25°C ; l'influence du pH initial 6.5, 6.0, 5.5 et 5.0 est étudiée sur la croissance de LV17 et la production de sa bactériocine. A pH 6.5, la production de la bactériocine est détectée dès la troisième heure d'incubation. La quantité de bactériocine atteint une valeur maximale en fin de phase exponentielle de croissance ou en début de phase stationnaire, soit après 9 heures d'incubation. L'activité antibactérienne reste stable pendant la phase stationnaire. Lorsque le pH initial est de 6.0, la quantité de bactériocine dosée dans le surnageant de culture est réduite de 50%. A des pH initiaux de 5.5 ou 5.0, la croissance est très faible et la production n'est pas détectée surtout à pH 5.0.

La croissance de *C. piscicola* LV61 et la production de sa bactériocine sont effectuées sur la base du milieu MRS en omettant l'acétate, en remplaçant le glucose par du saccharose, en ajustant le pH initial à 8.5 avec NaOH 10N et en cultivant la souche à 30°C (Schillinger et Holzapfel, 1990).

Dans le cas de la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a), des essais de production sont entrepris sur différents milieux de culture (GM17, BHI et MRS) et à différentes températures (4, 15, 22, 30, 34, 37 et 40°C). Quel que soit le milieu choisi, la croissance de *C. piscicola* UI49 est faible à 37°C et nulle à 40°C, induisant une non production de la carnocine UI49. Pour une gamme de températures de 15°C à 34°C, quel que soit le milieu, la production de la carnocine UI49 est détectée au début de la phase exponentielle de croissance. Le maximum d'activité antibactérienne dans le surnageant de culture correspond au début de la phase stationnaire de croissance. En fin de phase stationnaire, l'activité de la carnocine UI49 reste stable à 15°C mais elle est non décelée aux températures supérieures. De 15°C à 34°C, la quantité de bactériocine détectée dans le surnageant de culture augmente avec la température et elle est plus importante sur GM17 que sur BHI que sur MRS. Ce résultat est à mettre en relation avec la quantité importante de glucose dans le milieu GM17 qui pourrait induire la production (Schillinger et Lücke, 1989). Un autre facteur important est la présence de β -glycérophosphate (19 g.l⁻¹). Ayant un pouvoir tampon, il peut ralentir l'acidification, et maintenir une valeur de pH favorable à la croissance de *C. piscicola* UI49 et donc induire une meilleure production de la carnocine UI49. Dans le milieu MRS, contenant de l'acétate, dès que le pH est de l'ordre de 5.0 la croissance est stoppée. A 4°C, quel que soit le milieu de culture, l'activité de la carnocine UI49 n'est pas détectée en dépit de la croissance de la souche productrice.

Une condition majeure influençant la croissance des carnobactéries et la production de leur bactériocine est la valeur du pH initial du milieu de culture qui doit être supérieure à 6.5. La régulation du pH à cette valeur initiale est souhaitée. Ces conditions sont rapportées également dans le cas de la production de la pisciocine V1 (Pilet *et al.*, 1993). Un caractère commun dans la production des bactériocines des carnobactéries est la détection de l'agent antibactérien dès le début de la phase exponentielle de croissance. Cette production précoce pourrait être un facteur important favorisant la domination des carnobactéries productrices de bactériocines au sein d'une population de bactéries d'espèces proches.

3.4 MODE D'ACTION DES BACTERIOCINES DES CARNOBACTERIES

De façon générale, le mécanisme d'action des bactériocines des bactéries lactiques est encore peu étudié. Au sein du genre *Carnobacterium*, aucun résultat n'est rapporté. Cependant, plusieurs auteurs mentionnent des études de l'action de la bactériocine sur sa souche cible dans différentes conditions opératoires. Deux approches sont abordées en fonction des utilisations potentielles de la bactériocine ou de sa souche productrice comme agents de conservation : d'une part, la bactériocine partiellement purifiée est ajoutée à la souche cible qui se trouve soit dans un milieu de culture soit dans un tampon phosphate, d'autre part, dans la méthode de co-culture, c'est la souche productrice qui est directement mise en contact avec la souche cible dans un milieu semi-synthétique ou naturel.

L'addition de 64 UA.ml⁻¹ de bactériocine de *C. piscicola* LV61 à *C. divergens* L66 en culture dans un milieu MRS modifié réduit, en 15 minutes, le nombre de cellules viables de 4 log décimaux. Le niveau de population se stabilise alors pendant 7 heures. La bactériocine produite par *C. piscicola* LV61 a donc un effet bactéricide sur sa souche cible (Schillinger et Holzappel, 1990).

Un effet bactéricide est également observé dans le cas de la (des) bactériocine(s) produite(s) par *C. piscicola* LV17 contre *C. divergens* LV13 en tampon phosphate (50 mmol.l⁻¹, pH6.5) et en milieu APT, à 25°C. Dans ce dernier milieu, dès l'ajout de 100 UA.ml⁻¹ de bactériocine, une réduction de 3.5 log décimaux de la population de la souche cible est observée alors qu'en tampon phosphate il faut 1h 30 minutes. Dans les deux cas, ce taux se stabilise pendant 9 heures mais, après 24 heures d'incubation à 25°C, une augmentation de plus de 1 log décimal de *C. divergens* LV13 est remarquée par la reprise de croissance de la souche cible (Ahn et Stiles, 1990a). L'absorbance à 600 nm reste stable

pendant toute l'expérience indiquant l'absence de lyse cellulaire (Ahn et Stiles, 1990b). La bactériocine s'adsorbe non spécifiquement sur les cellules sensibles et résistantes et elle est active contre des protoplastes de *C. divergens* LV13 indiquant une localisation plasmique des sites récepteurs.

La carnocine UI49 a un effet bactéricide sur *L. lactis* NCDO497 (Stoffels *et al.*, 1992a). Cet effet est modulé par la température d'incubation. C'est à 34°C qu'il est le plus rapide : l'addition de 1000 BU.ml⁻¹ de bactériocine à 1.10⁷ ufc.ml⁻¹ de souche cible en tampon phosphate réduit cette population de 2 log décimaux en 30 minutes. Après 4 heures d'incubation, aucune cellule viable n'est dénombrée. Une diminution de 50% de l'absorbance à 620 nm indique qu'une lyse cellulaire accompagne l'effet bactéricide. A 30°C et 22°C, le phénomène est plus lent et au bout de 6 heures d'incubation, *L. lactis* NCDO497 est à un taux respectivement de 1.10³ et 5.10¹ ufc.ml⁻¹. A 15°C et 4°C, aucun effet bactéricide n'est observé. L'effet bactéricide est amélioré par l'addition de Tween 20 (0.1%) dans le milieu : à 30°C et 22°C, après 6 heures d'incubation, il n'y a plus de cellules viables dans le milieu. L'addition de Tween 20 (0.1%) ne permet cependant pas d'observer d'effet bactéricide à 15°C et 4°C. Le Tween 20 affecterait la conformation et la solubilité de la carnocine UI49 ce qui augmenterait son action, mais il pourrait aussi rendre la souche cible plus sensible à la bactériocine.

L'action de la bactériocine produite par *C. piscicola* LK5 contre *L. monocytogenes* Scott A est étudiée par la technique de co-culture (Buchanan et Klawitter, 1992a). Le milieu de co-culture est le trypticase soja, le taux d'inoculum est de 1.10¹⁰ pour *C. piscicola* LK5 et 1.10³ pour *L. monocytogenes* Scott A (taux pouvant être naturellement rencontré dans certains produits) ; les températures d'incubation sont 5°C et 19°C. L'isolat LK5 exerce un effet bactériostatique sur *L. monocytogenes* Scott A principalement à 5°C. A 19°C, aucun effet n'est observé. L'effet bactériostatique apparaît lié à la vitesse de croissance relative des deux micro-organismes. Le taux de croissance d'une carnobactérie est supérieur à celui d'une listeria à 5°C alors qu'à 19°C les taux sont équivalents. L'effet bactériostatique n'est pas modifié par la disponibilité en oxygène, par la présence de NaCl jusqu'à 4%, est amélioré à des pH proches de la neutralité (5.5-6.5) par rapport aux pH acides. Le pouvoir bactériostatique de LK5 sur *L. monocytogenes* est testé dans différents aliments réfrigérés. Le contrôle de la croissance de *L. monocytogenes* Scott A est favorisé dans des produits ayant subi des traitements technologiques, pasteurisation, irradiation (lait UHT, viande en boîte pour animaux, boeuf stérilisé par irradiation, crabe pasteurisé, saucisses) qui limite ou élimine la microflore naturelle par rapport à des produits frais (boeuf frais cru, poulet) initialement plus fortement contaminés.

3.5 PURIFICATION DES BACTERIOCINES DES CARNOBACTERIES

3.5.1 OBTENTION DE MOLECULES PURES

Pour la purification des bactériocines de carnobactéries, les techniques classiques de séparation des protéines sont utilisées : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie basse pression (résines échangeuses d'ions et résines d'interactions hydrophobes, filtration sur gel) et chromatographie haute pression (HPLC) sur support de type phase inverse.

Le degré de pureté est généralement contrôlé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un agent dissociant, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Sur un tel gel, l'activité biologique inhibitrice de la bactériocine est révélée par bioautographie selon le protocole décrit par Bhunia *et al.* (1987). La révélation chimique de la bactériocine au nitrate d'argent y est difficile (Van Laack *et al.*, 1992) en raison du faible poids moléculaire des bactériocines (3-5000 Da), souvent difficilement colorables (Piard *et al.*, 1992).

Jusqu'à maintenant, quatre bactériocines de carnobactéries ont été purifiées jusqu'à homogénéité : la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992b), les carnobactériocines A et B (Worobo *et al.*, 1993 et Quadri *et al.*, 1993) et la piscicoline 61 (Schillinger et Holck, 1993). Les protocoles de purification de chacune d'elles sont présentées dans le tableau 5. Trois ou quatre étapes sont nécessaires pour l'obtention d'une molécule pure. La carnocine UI49 et la piscicoline 61 sont purifiées suivant la même séquence chromatographique alors que la purification des carnobactériocines A et B requiert des chromatographies reposant uniquement sur des interactions hydrophobes. Les rendements de récupération sont faibles et varient de 1% (Stoffels *et al.*, 1992b) à 0.06% (Quadri *et al.*, 1993). L'ultime étape de purification révèle pour les carnobactériocines A et B trois pics d'activité élués entre 20% et 30% d'acétonitrile additionné de 0.1% de TFA et respectivement nommés A1, A2, A3 et B1, BM1, B2. La carnocine UI49 est éluee dans un seul pic sur support de type phase inverse dans 90% d'un mélange méthanol / isopropanol (90/10).

Tableau 5 : Protocoles de purification des bactériocines de carnobactéries

	carnocine UI49	carnobactériocine A	carnobactériocine B	piscicoline 61
Milieu de production	MRS 30°C	Milieu CAA ¹⁾ régulé à pH 6.2, 25°C	Milieu CAA ¹⁾ régulé à pH 6.2, 25°C	D-MRS ²⁾ , pH initial à 8.5
1ère étape	précipitation (NH ₄) ₂ SO ₄ à 40% saturation	Amberlite XAD-8 équilibrée avec 0.1% TFA		précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ , % non précisé
2ème étape	passage sur résine échangeuse de cations S-Sépharose. Elution à 0.2 M NaCl	Sephadex LH60 équilibrée avec 50% acétonitrile		résine échangeuse d'ions
3ème étape	résine d'interactions hydrophobes Phenyl-Sépharose, 8% (NH ₄) ₂ SO ₄ dans l'échantillon, élution à 5% (NH ₄) ₂ SO ₄	séparation sur HPLC, élution à un gradient 20-30% acétonitrile + 0.1% TFA / \ A1 A2 A3 B1 BM1 B2		résine d'interactions hydrophobes
4ème étape	chromatographie sur colonne C ₂ -C ₁₈ élution à 90% du solvant carnocine UI49			séparation HPLC piscicoline 61
Rendement	1%	non déterminé	0,06% 0.19% 0.44%	non déterminé
Références	Stoffels <i>et al.</i> , 1992b	Worobo <i>et al.</i> , 1993	Quadri <i>et al.</i> , 1993	Schillinger et Holck, 1993

1) Milieu semi-défini (Hastings *et al.*, 1991)

2) Milieu MRS (de Man *et al.*, 1960) sans acétate, le saccharose remplace le glucose

3.5.2 ANALYSE DE LA STRUCTURE

L'hydrolyse acide (HCl, 6N, 110°C) suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions permet d'estimer la composition en acides aminés des bactériocines purifiées pour lesquelles la séquence en acides aminés est établie par la méthode de dégradation récurrente d'Edman. L'analyse du spectre de masse fournit une estimation du poids moléculaire de la molécule pure ainsi que des indications sur la modification éventuelle de certains acides aminés (oxydation, pont disulfure). Le tableau 6 résume les caractères physico-chimiques des bactériocines des carnobactéries purifiées à homogénéité.

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des bactériocines purifiées au sein du genre *Carnobacterium*

	carnocine UI49 (*)	carnobactériocine A			carnobactériocine B		
		A1	A2	A3	B1	BM1	B2
nombre de résidus d'acides aminés (Edman)	7 acides aminés du côté N-terminal	55	53	53	43	43	48
masse donnée par la composition en acides aminés (Da)	35 à 37 résidus 3610	non déterminée			4527,12	4527,12	4969,49
masse donnée par analyse du spectre de masse (Da)	4635	5100	5123	5127	4541,9 ±0.6	4524,6 ± 0.6	4969,9 ± 0.7

(*) par SDS-PAGE, le PM de la carnocine UI49 est estimé entre 4500 et 5000 Da.

Dans le cas de la carnobactériocine A (Worobo *et al.*, 1993) la séquence en acides aminés des trois formes, obtenue selon la méthode d'Edman, dénombre 53 résidus pour chacune d'elles. L'analyse du spectre de masse révèle que la forme A3 est considérée comme étant la bactériocine parentale et qu'elle contient un pont disulfure entre les cystéines 22 et 51. Pour la forme A2 l'analyse du spectre de masse révèle une oxydation du soufre de

la méthionine 52. La forme A1 apparaît être un sous-produit des formes A2 et A3. La présence d'un seul gène de structure *cbn A* confirme qu'une seule carnobactériocine A, ayant plusieurs formes, est produite par la souche LV17 A. Les bactéries du genre *Listeria* ne sont pas inhibées par cette bactériocine qui agit principalement sur d'autres carnobactéries.

Pour la carnobactériocine B (Quadri *et al.*, 1993), les trois formes B1, BM1 et B2 sont actives contre d'autres carnobactéries, les genres *Pediococcus*, *Listeria*, *Enterococcus* et contre *Lactobacillus plantarum*. La différence entre les formes B1 et BM1 réside dans l'oxydation du soufre de la méthionine 41 dans la forme B1 qui a lieu dans des conditions acides réduisant l'activité antibactérienne de 4 à 8 fois. L'analyse du spectre de masse de la forme non oxydée BM1 donne une différence de 2.5 Da avec la masse calculée à partir de la composition en acides aminés, laissant supposer la présence d'un pont disulfure entre les résidus cystéine 10 et 15. LV17 B produit deux bactériocines BM1 et B2 de nature non lantibiotique. BM1 et B2 entrent dans la série des bactériocines anti-*Listeria* possédant la séquence consensus du côté N-terminal - Tyr - Gly - Asn - Gly - Val - Xaa - Cys -. Celle-ci a déjà été rencontrée dans plusieurs autres bactériocines de bactéries lactiques : pédiocine PA-1 (Henderson *et al.*, 1992 ; Marugg *et al.*, 1992), sakacine A (Holck *et al.*, 1992), sakacine P et curvacine A (Tichaczek *et al.*, 1992), leucocine A (Hastings *et al.*, 1991), mésentéricine Y105 (Hécharde *et al.*, 1992a), bavarcine A (Larsen *et al.*, 1993).

La méthode de dégradation récurrente d'Edman appliquée à la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a) permet d'établir la séquence de l'extrémité N-terminale pour sept acides aminés seulement : N - Gly - Ser - Glu - Ile - Gln - Pro - Arg -. Aucun dérivé phénylthiohydantoïne supplémentaire n'est obtenu même après six cycles de dégradation laissant supposer la présence de lanthionine. La composition en acides aminés révèle la présence de 35 à 37 résidus incluant un motif lanthionine et déterminant une masse de 3610 Da. Par analyse du spectre de masse et par électrophorèse en SDS-PAGE, le poids moléculaire de la carnocine UI49 est estimé respectivement à 4635 Da et entre 4500 - 5000 Da. Les bactériocines du genre *Listeria* ne sont pas inhibées par la carnocine UI49.

3.6 GENETIQUE DES BACTERIOCINES DES CARNOBACTERIES

A notre connaissance la seule étude publiée, au sein du genre *Carnobacterium*, de déterminisme génétique de la production de bactériocine et de la résistance à celle-ci, est celle menée sur la souche *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990b ; Ahn et Stiles, 1992 ; Quadri *et al.*, 1993 ; Worobo *et al.*, 1993).

3.6.1 CURE PLASMIDIQUE

L'obtention de protoplastes est un moyen de cure d'ADN plasmidique (Gasson, 1980). Des protoplastes de la souche *C. piscicola* LV17 sont obtenus et les clones régénérés font l'objet d'un criblage pour la production de bactériocine contre *C. divergens* LV13 (Ahn et Stiles, 1990b). Deux phénotypes sont obtenus, l'un noté Bac^P pour des variants partiellement producteurs de bactériocine, l'autre noté Bac⁻ pour des variants ayant complètement perdu l'activité bactériocine. Quelques variants sont récupérés malgré leur phénotype identique à celui de la souche sauvage *C. piscicola* LV17. L'étape suivante est la réalisation de profils d'ADN plasmidique de LV17 et de ses différents variants (Tableau 7).

Tableau 7 : Contenu plasmidique de la souche sauvage *C. piscicola* LV17 et des variants récupérés lors de l'obtention de protoplastes induisant une cure plasmidique. Pourcentage de production de bactériocine pour chacun (Ahn et Stiles, 1990b).

Souche	Phénotype	Plasmide	Production (%)
<i>C. piscicola</i> LV17*	Bac ⁺	pCP9, pCP40, pCP49	100
Variant LV17.9.49	Bac ^P	pCP9, pCP49	80
Variant LV17.C6	Bac ^P	pCP9, pCP40	20
Variant LV17.C1	Bac ⁻	pCP9	0
Variant LV17.C2	Bac ⁻	aucun plasmide	0
Variant LV17.C5	Bac ⁺	pCP9, pCP37, pCP57	100

* Le profil d'ADN plasmidique donne en fait quatre bandes de 9, 23.5, 40 et 49 MDa. Mais le plasmide pCP23.5 s'avère être la forme circulaire ouverte du plasmide pCP9. Donc la souche sauvage *C. piscicola* LV17 contient les plasmides suivants : pCP9, pCP40 et pCP49.

Dans le cas du variant LV17.C5, le changement de taille des deux plasmides les plus "gros" peut être dû à un réarrangement des deux plasmides pCP40 et pCP49. Le variant LV17.9.49 (perte du plasmide pCP40) est partiellement sensible à la bactériocine parentale mais insensible à sa propre bactériocine et à celle produite par le variant LV17.C6. Ce dernier (perte du plasmide pCP49) est sensible à la bactériocine parentale et également à celle du variant LV17.9.49, mais il est insensible à sa propre bactériocine. Il faut signaler que la souche sauvage *C. piscicola* LV17 est insensible aux bactériocines produites par les variants LV17.9.49 et C6, comme à sa propre bactériocine.

A ce stade, il se trouve que deux plasmides pCP40 et pCP49 sont associés dans la production de bactériocine et dans la résistance à la bactériocine produite. Le plasmide pCP40 intervient pour 20% de la production par rapport au plasmide pCP49 qui est responsable de 80% de la production. L'association des deux plasmides dans la souche sauvage conduit à une production supérieure à celle obtenue lorsque ces deux plasmides sont séparés (Tableau 7).

3.6.2 MOBILISATION DES PLASMIDES PAR CONJUGAISON

Dans le but de localiser au moins l'un des deux gènes de production, des expériences de conjugaison entre la souche donneuse *C. piscicola* LV17 et le variant LV17.C2, ne contenant pas de plasmide, sont envisagées. Elles s'avèrent toutes infructueuses : les plasmides pCP40 et pCP 49 de *C. piscicola* LV17 ne sont pas conjuguatifs. L'introduction par conjugaison du plasmide pAM β 1 dans la souche LV17 permet de mobiliser ses plasmides, lors d'un croisement entre *C. piscicola* LV17 et le variant Bac⁻ LV17.C2. Pour des besoins de sélection, ce dernier contient le plasmide pNZ12, porteur de la résistance au chloramphénicol ; il est noté LV17.C2.NZ (Ahn et Stiles, 1992).

Différents transconjugants sont récupérés :

- 1°) seul le plasmide pAM β 1 est transféré. Variant pAM.NZ
- 2°) le plasmide pAM β 1 est transféré avec le plasmide pCP40. La production de la bactériocine est partielle (20%). Variant 40.pAM.NZ
- 3°) le plasmide pAM β 1 est transféré avec tous les autres plasmides. La production de la bactériocine est équivalente à celle de la souche sauvage (100%). Variant LV17.pAM.NZ

4°) le plasmide pAM β 1 est transféré avec un seul nouveau plasmide de 89MDa. La production de la bactériocine est équivalente à celle de la souche sauvage (100%). Variant 89.pAM.NZ

Aucun transconjugant ne contient les plasmides pCP9 et pCP49 séparés. Parmi ces transconjugants, le variant 40.pAM.NZ produit une bactériocine active contre *C. divergens* LV13 et contre le variant LV17.C2 (mutant sans plasmide). Il est résistant à sa propre bactériocine et sensible aux bactériocines produites par les transconjugants LV17.pAM.NZ et 89.pAM.NZ. En revanche ce dernier est résistant aux bactériocines de la souche sauvage *C. piscicola* LV17.

L'objectif maintenant est de comparer la production de bactériocine pour une souche ne contenant que le plasmide pCP40 et une autre ne contenant que le pCP49.

Le variant ne contenant que le pCP40 est obtenu par la perte spontanée des plasmides marqueurs de résistance pAM β 1 et pNZ12 du variant 40.pAM.NZ par des repiquages successifs sur des milieux dépourvus de chloramphénicol et d'érythromycine. Ce variant est appelé LV17.40. Il est à noter que dans ces mêmes conditions, le transconjugant 89.pAM.NZ perd également les deux plasmides marqueurs avec apparition de deux nouveaux plasmides de 37 MDa et 51 MDa.

Le variant ne contenant que le pCP49 est obtenu en re-sélectionnant des mutants à partir de l'isolat LV17.9.49 par la technique d'obtention de protoplastes induisant une cure d'ADN plasmidique. Ce variant est noté LV17.49.

LV17.40 et LV17.49 sont actifs l'un contre l'autre mais sont résistants à leur propre bactériocine. La souche cible *Lb. delbrueckii* NCK 235 est sensible à la bactériocine produite par LV17.40 mais est résistante à celle produite par LV17.49. Chacun des deux plasmides code pour une bactériocine et la résistance à celle-ci de façon indépendante. Chaque variant inhibe l'autre et les deux plasmides rassemblés conduisent à une activité antibactérienne supérieure à celle obtenue par chacun des plasmides seuls. Ainsi, le plasmide pCP49 est responsable de la production de la carnobactériocine A (Worobo *et al.*, 1993) et le plasmide pCP40 de la carnobactériocine B (Quadri *et al.*, 1993).

3.6.3 CLONAGE DE FRAGMENTS D'ADN CODANT POUR LA BIOSYNTHESE DES BACTERIOCINES

Des fragments de restriction du pCP49 par BglIII ont été clonés chez deux souches réceptrices différentes : l'une est le variant LV17.C2 ne contenant pas de plasmide, l'autre est une souche sauvage *C. piscicola* UAL26 (Ahn et Stiles, 1990a) produisant une bactériocine dont le gène est chromosomique, et qui a un spectre d'activité différent de celui de *C. piscicola* LV17. La souche donneuse du plasmide pCP49 est LV17.49 et le vecteur est le pCaT, un plasmide de 8.5 kb porteur de la résistance au chloramphénicol. Les souches réceptrices sont électroporées par le mélange de ligation. Les transformants sont récupérés pour leur production de bactériocine. Le gène de production de la souche LV17.49 est localisé sur un fragment de 25.5 kb du plasmide pCP49, digéré par BglIII. Lorsque la souche réceptrice est *C. piscicola* UAL26, les transformants récupérés exercent une activité inhibitrice qui réunit les spectres d'action dus à la présence de la carnobactériocine A et de la bactériocine UAL26.

Cette expérience de clonage laisse des espoirs dans la possibilité de créer des souches productrices de bactériocines plus efficaces surtout dans le cas des bactéries lactiques à usage industriel (Klaenhammer, 1988). Il faut également noter la stratégie de conjugaison pour transférer les plasmides pCP40 et pCP49 non conjugatifs. En sachant que le plasmide pAM β 1 est un plasmide ayant une large gamme de bactéries hôtes avec un pouvoir conjugatif parmi les bactéries lactiques, il pourrait de façon générale être utilisé pour introduire dans les ferments lactiques des fonctions codées par un plasmide. Une fois formés, les transconjugants conservant les propriétés désirées mais curés du plasmide pAM β 1 pourraient de nouveau recevoir le statut de "food grade" (Klaenhammer, 1993).

Pour chacune des deux souches, LV17A ne contenant que le plasmide pCP49 et produisant la carnobactériocine A active contre d'autres carnobactéries, et LV17B ne contenant que le plasmide pCP40 et produisant la carnobactériocine B active notamment contre *Listeria*, le déterminisme génétique de production est poursuivi grâce à l'obtention des carnobactériocines A et B pures. Pour localiser les gènes de structure des carnobactériocines A et B, des sondes oligonucléotidiques sont préparées à partir de la séquence en acides aminés N-terminale des bactériocines purifiées. Ces sondes sont hybridées avec des fragments de restriction des plasmides pCP40 et pCP49 et de l'ADN génomique, coupés par EcoRI, Hind III, EcoRI-PstI. Les fragments ayant hybridés avec la sonde sont clonés et séquencés.

Dans le cas de LV17A, Worobo *et al.* (1993) observent l'hybridation de la sonde oligonucléotidique avec un fragment EcoRI de 2.4 kb du plasmide pCP49. Son séquençage montre une seule ORF (cadre ouvert de lecture) qui code pour la bactériocine de 53 acides aminés et aussi pour une extension de 18 acides aminés du côté N-terminal. Cette extension peptidique contient 2 résidus Glycine précédant les 53 acides aminés de la carnobactériocine A, elle correspondrait au peptide leader qui est une caractéristique commune à d'autres bactériocines de bactéries lactiques (Klaenhammer, 1993). Lors de la purification, les profils obtenus sur HPLC indiquent la présence de 3 carnobactériocines A. Mais les résultats d'hybridation et de séquençage montrent la présence d'un seul gène de structure *cbnA*. Les régions adjacentes au gène de structure *cbnA* sont clonées en vue de localiser le gène d'immunité. Un fragment EcoRI-XbaI de 3.2 kb est récupéré. Il est actuellement en cours de séquençage.

Dans le cas de LV17B (Quadri *et al.*, 1993) deux carnobactériocines BM1 de 43 acides aminés et B2 de 48 acides aminés sont produites. Une sonde oligonucléotidique est préparée à partir de chacune des séquences N-terminales. D'un côté un fragment d'ADN chromosomique EcoRI-PstI de 4.0 kb hybride avec la sonde BM1. De l'autre, c'est un fragment HindIII de 1.9 kb du plasmide pCP40 qui hybride avec la sonde B2. Ainsi, le gène de structure de BM1 (*cbn BM1*) est localisé sur le chromosome alors que celui de B2 (*cbn B2*) est localisé sur le plasmide pCP40.

Le séquençage de *cbn BM1* montre deux ORF, ORF $\alpha 1$ (*cbn BM1*) et ORF $\alpha 2$ (*cbn BM1*) codant respectivement pour des polypeptides de 61 et 88 acides aminés. Le séquençage de *cbn B2* met en évidence trois ORF, ORF $\beta 1$, ORF $\beta 2$ et ORF $\beta 3$ codant respectivement pour des polypeptides de 66, 111 et 89 acides aminés. Les deux carnobactériocines BM1 et B2 sont synthétisées sous forme de pré-bactériocine avec un peptide leader de 18 acides aminés qui est clivé au niveau d'un site Gly-Gly pour donner les bactériocines matures. Pour BM1 l'ORF concernée est ORF $\alpha 1$ et pour B2 c'est l'ORF $\beta 1$. Selon les auteurs ORF $\beta 2$ code pour l'immunité vis à vis de la carnobactériocine B2.

Par des études d'expression dans des cellules hôtes homologues ou hétérologues, un fragment de 16 kb du pCP40 est trouvé être responsable de l'expression phénotypique de la carnobactériocine B2. Ce même fragment code aussi pour des facteurs requis pour l'expression phénotypique de la bactériocine "chromosomique" BM1 et de son immunité. Enfin, l'introduction de ce fragment dans des cellules hôtes ayant leur propre production conduit à une augmentation de l'activité anti-*Listeria* (Quadri *et al.*, 1993)

RESULTS

SOMMAIRE DES RESULTATS

La plupart des résultats obtenus, ayant fait l'objet de publication ou étant en voie d'être publiés, seront présentés sous la forme d'une succession d'articles rédigés en anglais. Ceux-ci comportent différentes parties : un résumé des travaux, une introduction, un chapitre matériel et méthodes, une présentation des résultats, une discussion ainsi que des références bibliographiques. Chaque article est précédé d'une présentation brève et d'un résumé des résultats, tous deux rédigés en français.

PUBLICATION N°1

Presence of *Carnobacterium* spp. in French Surface Mould-Ripened Soft-Cheese

J.B. MILLIERE, M. MICHEL, F. MATHIEU and G. LEFEBVRE

Article publié
dans Journal of Applied Bacteriology
Vol 76 (3) 264-269

Cette publication rapporte des travaux du laboratoire, dirigés par J.B. Millière, qui ont permis de mettre en évidence pour la première fois, à notre connaissance, la présence du genre *Carnobacterium* dans des fromages.

PUBLICATION N°2

PROPERTIES OF A BACTERIOGIN PRODUCED BY *Carnobacterium piscicola* CP5

MATHIEU F., MICHEL M. and LEFEBVRE G.

Article publié dans Biotechnology Letters.
Volume 15 No. 6 (June 1993) pp. 587-590

Cet article rapporte la détection de la production d'une activité de type bactériocine par un isolat identifié à *Carnobacterium piscicola* codé CP5, provenant d'un fromage de Brie. La bactériocine est appelée carnocine CP5. Cet article décrit plusieurs propriétés de cette activité, étudiées de façon préliminaire, dans des préparations brutes.

PUBLICATION N°3

Characterization and plasmid-linkage of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5

MATHIEU, F., MATHIS, R., LEBRIHI, A. and LEFEBVRE, G.

Article en préparation

Cet article rapporte les méthodes qui nous ont permis d'estimer le poids moléculaire de la carnocine CP5 dans un extrait brut : filtration sur gel (échantillon traité ou non avec de l'urée à 8 mol.l⁻¹) et électrophorèse en conditions dénaturantes en présence de SDS (SDS-PAGE). Des premiers essais sont effectués pour précipiter la carnocine CP5 au sulfate d'ammonium. L'interaction de la carnocine CP5 avec différentes résines chromatographiques en basse pression est étudiée. Par des cures d'ADN plasmidique, des mutants non producteurs de bactériocine sont obtenus.

PUBLICATION N°4

Purification and partial amino-acid sequence of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5

MATHIEU, F., MATHIS, R., LEBRIHI, A. and LEFEBVRE, G.

Article en préparation

Cet article décrit le protocole de purification de la carnocine CP5, incluant une précipitation au sulfate d'ammonium, une résine échangeuse d'anions et une résine à interactions hydrophobes en tant que chromatographie basse pression et pour finir une chromatographie haute pression sur une colonne hydrophobe de type C₈. Ce protocole conduit à l'obtention de la carnocine CP5 sous deux pics d'activité CP51 et CP52. Pour le pic CP51, une séquence partielle de l'extrémité N-terminale est obtenue par la méthode récurrente d'Edman.

PUBLICATION N°5

Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures

MATHIEU F., MICHEL M., LEBRIHI A. and LEFEBVRE G.

Article MS 998/93 accepté pour publication dans
International Journal of Food Microbiology

Cet article rapporte le mode d'action de la carnocine CP5, partiellement purifiée, ou de la souche productrice *C. piscicola* CP5 sur des cellules en croissance de *L. monocytogenes* ATCC 15313, dans un milieu semi synthétique ou sur du lait, à différentes températures d'incubation. Une étude avec des cellules cibles au repos dans de l'eau physiologique est également décrite.

PUBLICATION N°1

**Presence of *Carnobacterium* spp. in French Surface
Mould-Ripened Soft-Cheese**

J.B. MILLIERE, M. MICHEL, F. MATHIEU and G. LEFEBVRE

Publiée dans
Journal of Applied Bacteriology
Vol 76, (3) 264-269

PRESENTATION DES TRAVAUX

Cinq fromages à pâte molle et à croûte fleurie, de type Brie, fabriqués en France à différents moments d'une année, font l'objet d'une étude microbiologique destinée à recenser la flore microbienne de chacun en fin d'affinage. De ces cinq fromages, sont isolées des bactéries lactiques couramment rencontrées dans les produits laitiers (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*), mais également un groupe bactérien dominant en fin d'affinage (de 1.10^8 à 1.10^9 ufc.g⁻¹) dont nous avons pu obtenir 36 isolats se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positif et dépourvus de catalase, ayant des caractéristiques communes : production d'acide lactique de type L(+), présence d'acide meso-diaminopimélique dans la paroi, hydrolyse de l'arginine et non fermentation du sorbitol. Ces caractères communs ne permettent cependant pas l'identification de ce groupe à une ou des espèces connues du genre *Lactobacillus*. La description des bactéries appartenant au genre *Carnobacterium* récemment proposé par Collins *et al.* (1987) pour des bactéries proches des lactobacilles, isolées de viande ou de poisson, oriente l'identification des 36 isolats vers ce genre bactérien. Finalement, l'hybridation ADN/ADN avec des sondes d'ADN chromosomique correspondant aux espèces du genre *Carnobacterium* a permis d'identifier définitivement ces 36 isolats à ce genre. Chaque isolat est testé pour une production éventuelle de substance antibactérienne contre les 35 autres et lui-même.

PRINCIPAUX RESULTATS

Les trente-six "lactobacilles atypiques" représentent la flore dominante des flores mésophile et psychrotrophe des 5 fromages, avec des populations de 1.10^8 à 1.10^9 ufc.g⁻¹ (Tableau 1) en fin d'affinage des fromages. Ceux-ci ont tous un pH compris entre 6.8 et 7.6 et ne présentent aucun défaut organoleptique. Les trente-six isolats sont homofermentaires, ne poussent pas sur un milieu acétate à pH 5.5 (milieu de Rogosa) ni sur BHI, MRS ou EB à pH 5.0. Mais leur croissance est rétablie à un pH proche de 7.0 quel que soit le milieu. Leur croissance est observée sur un milieu EB contenant 5% de NaCl, mais non 8%. Avec les caractéristiques biochimiques des 36 isolats comparées avec celles des espèces du genre *Carnobacterium* (Tableau 2) et les résultats d'hybridation (Fig.1.), l'identification des espèces est la suivante : 33 *C. piscicola* et 3 *C. divergens*. Seize isolats parmi les 36 produisent une substance antibactérienne contre les autres carnobactéries et 6 contre, également, les souches de référence *C. piscicola* DSM 20722, DSM 20730, *C. divergens* DSM 20623, DSM 20624, *C. gallinarum* DSM 4847, et *C. mobile* 4848.

Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese

J.B. Millière, M. Michel, F. Mathieu and G. Lefebvre

Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre, France

4578/05/93: accepted 11 September 1993

J.B. MILLIÈRE, M. MICHEL, F. MATHIEU AND G. LEFEBVRE. 1994. Thirty-six 'atypical lactobacilli', randomly picked from five surface mould-ripened soft-cheeses, were characterized by physiological and chemical, including DNA, analyses. This homofermentative, non-aciduric and psychrotrophic group represented the major bacterial flora with counts between 10^8 and 10^9 cfu g^{-1} . Common characteristics were the production of L-(+)-lactic acid enantiomer, the presence of *meso*-diaminopimelic acid in the peptidoglycan, the hydrolysis of arginine and the failure to produce acid from sorbitol. On the basis of the description of the genus *Carnobacterium* (Collins *et al.* 1987), 33 isolates were assigned to *C. piscicola* and three to *C. divergens*. Antibacterial substance production was observed for 16 isolates, with a narrow spectrum of activity. To our knowledge, this is the first report of *Carnobacterium* spp. in mould-ripened soft-cheese.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria are the major group of micro-organisms found in dairy products. Often added as starter cultures or initially present as natural flora in raw cheese milk, they actively participate by their metabolism in the acceptability of fermented milks and cheeses. Most published bacteriological analyses indicate that the majority of isolates from raw products can be identified to species level by physiological tests only. However, some publications report difficulties in the identification of Gram-positive, catalase-negative rods with atypical phenotypic characteristics. These isolates are frequently designated *Lactobacillus*-type bacteria or atypical lactobacilli.

In the literature, such atypical isolates have been noted frequently in meat products stored at low temperature (Thornley and Sharpe 1959) or radurized (Niemand and Holzapfel 1984) and packaged under various gas atmospheres (Grant and Patterson 1991) and more rarely in fish (Hiu *et al.* 1984; Baya *et al.* 1991).

A number of attempts have been made to classify such strains (Shaw and Harding 1984; Schillinger and Lücke 1987) and Collins *et al.* (1987) classified some of these non-aciduric lactobacilli in a new genus *Carnobacterium*, to include the species *C. divergens* (*Lact. divergens*; Holzapfel and Gerber 1983), *C. piscicola* (*Lact. carnis*; Shaw and

Harding 1985; *Lact. piscicola*; Hiu *et al.* 1984), *C. gallinarum* and *C. mobile*.

In France the heterogeneous lactic acid flora naturally present in raw milk are involved in the production of a range of traditional raw milk cheeses such as surface mould-ripened soft-cheeses. Bacteriological analyses of Brie cheese in our laboratory showed the predominant flora to consist of Gram-positive, catalase-negative, rod-shaped bacteria, with non-aciduric and psychrotrophic properties, that were difficult to assign to any of the known *Lactobacillus* species, on the basis of phenotypic characterization.

The aim of this study was to attempt to determine whether these 'atypical lactobacilli' from dairy products are members of the genus *Carnobacterium*.

MATERIALS AND METHODS

Reference strains

The 14 reference strains used for phenotypic tests and DNA hybridization studies were: *Lactobacillus casei* ssp. *casei* DSM 20011; *Lact. plantarum* DSM 20174; *Lact. curvatus* DSM 20019; *Lact. sake* DSM 20017; *Lact. alimentarius* DSM 20249; *Lact. brevis* DSM 20054; *Lact. buchneri* DSM 20057; *Lact. fermentum* DSM 20052; *Carnobacterium divergens* DSM 20623 and DSM 20624; *C. piscicola* DSM 20730 and DSM 20722; *C. gallinarum* DSM 4847; and *C. mobile* DSM 4848. All strains were obtained from the DSM collection (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

Correspondence to: Professor J.B. Millière, Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire, ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre, France.

Zellkulturen, GmbH, Braunschweig, Germany). The stock cultures were stored at -20°C and were cultured twice at 30°C before use.

Microbiological examination

Five samples of Brie cheese, manufactured in France in five dairy plants during different periods of the year, were examined and their microbial flora enumerated and characterized. Fractions of whole cheese were homogenized in physiological saline solution with 0.1% (w/v) typtone in a Sorvall mixer for 2 min. After serial decimal dilution the suspensions were mixed with $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ amphotericin and $40\ \mu\text{g ml}^{-1}$ nalidixic acid (Sigma) and plated on non-selective agar media for the enumeration of aerobic psychrotrophic (7°C for 10 d) and mesophilic bacteria (30°C for 3 d) and on elective agar media, for lactic acid, halotolerant, lipolytic and proteolytic bacteria (Table 1). After incubation, isolates were randomly picked from different culture conditions.

Identification of isolates

The isolates were identified by the differential characters listed by Kandler and Weiss (1986). The tests used were

catalase activity, motility, pigment production, growth at 7°C and 45°C in MRS broth (de Man *et al.* 1960), production of CO_2 from glucose in MRS broth with an inverted Durham tube and by the method of Gibson and Abd-el-Malek (1945), and carbohydrate fermentation. This last test was done in MRS broth, minus beef extract and glucose, but containing 0.017% (w/v) bromocresol purple as indicator and with 1% (w/v) of the following sterile sugar solutions added: amygdalin, aesculin, glucose, melibiose, raffinose, rhamnose, ribose, sorbitol and xylose. After inoculation the tube contents were covered with sterile liquid paraffin. Arginine dihydrolase was observed according to Møller (1955) in Møller decarboxylase broth base (Bio-Mérieux) with 0.05% (w/v) glucose and 1% (w/v) arginine.

Further discriminant tests for atypical lactobacilli

Of the 181 Gram-positive rod-shaped isolates, 36 could not be identified and were designated 'atypical lactobacilli' (Table 1). These mesophilic and homofermentative isolates hydrolysed aesculin and produced acid from amygdalin, glucose and ribose but not from melibiose, raffinose, rham-

Table 1 Origin of the 36 'atypical lactobacilli' isolates from five Brie cheeses

Types of microflora	Media used	Brie cheese samples					Total
		1	2	3	4	5	
Aerobic psychrotrophic flora (7°C , 10 d)	PCA-agar (Plate Count Agar, Difco†) +0.1% (w/v) skim milk	1 (-6)*	1 (-7)	1 (-7)	1 (-6)	2 (-6)	6
Aerobic mesophilic flora (30°C , 3 d)	PCA-agar (Biokar†)	1 (-7)	1 (-6) 1 (-7)		2 (-6)		5
	King B-agar (Bio-Mérieux†)	1 (-5)	1 (-5) 1 (-6)	1 (-6)		1 (-7)	5
Lactic acid flora (30°C , 3 d)	MRS-agar (1960) (Biokar)	1 (-6) 1 (-7)		1 (-7)	1 (+1) 1 (-2)		5
	Elliker-agar (Elliker <i>et al.</i> 1956) (Biokar)	1 (-1)				1 (+1) 1 (-6)	3
	TSB-agar (Trypticase Soy Broth) (Bio-Mérieux) +5% (w/v) NaCl +7.5% (w/v) NaCl	1 (-6) 1 (-3)		1 (-6) 2 (-6)	1 (-7)		3 4
Lipolytic flora (30°C , 3 d)	Sierra agar (Sierra 1957) +0.1% (w/v) Nile blue sulphate		1 (-6)	1 (-6)	1 (-4)		3
Caseolytic flora (30°C , 3 d)	Milk-agar (5% w/v skim milk)			1 (-5) 1 (-6)			2
Total		8	7	9	7	5	36

* Values in brackets indicate the decimal dilution from which the isolates were picked.

† Bio-Mérieux, Charbonnières-les-Bains, France; Biokar Diagnostics, Beauvais, France; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA.

Table 2 Differentiating biochemical characteristics between *Carnobacterium* type-strains and the 36 'atypical lactobacilli' isolates from surface mould-ripened soft-cheeses

Tests	Biochemical characteristics				
	<i>C. divergens</i> DSM 20623	<i>C. gallinarum</i> DSM 4847	<i>C. mobile</i> DSM 4848	<i>C. piscicola</i> DSM 20730	36 isolates from soft-cheese†
Acid production from:					
Amygdalin	+	+	-	+	+36
Galactose	-	+	+	+	+32
Glycerol	+	-	-	+	+36
Inulin (w)§	-	-	+	+(-*)	+33
Lactose	-	+	+(-†)	+(-*)	+36
Mannitol	-	-	-	+	+33
α -Methyl-D-glucoside (w)	-	+	-	+	+33
α -Methyl-D-mannoside (w)	-	-	-	+(-*)	+31
D-Tagatose	-	+	-(+†)	-	-0
D-Xylose (w)	-	+	-	-	-4
Haemolysis (sheep blood)	-	-	+	-	-0
Voges-Proskauer	+	+	-	+	+36
β -Galactosidase	-	+	+	+	+36

* Results from Hiu *et al.* 1984.

† Collins *et al.* 1987; lactose, no hydrolysis with *C. mobile* DSM 4848; tagatose, occasional strains positive.

‡ Number of strains giving positive results.

§ (w), Tests giving a weak result.

The 36 isolates produced acid on arbutin, D-cellobiose, D-fructose, gluconate, D-glucose, maltose, D-mannose, melezitose (w), N-acetylglucosamine, ribose, salicin, sucrose, trehalose, turanose and hydrolysed aesculin.

No acid was produced from: adonitol, D- and L-arabinose, D- and L-arabitol, dulcitol, erythritol, D- and L-fucose, β -gentiobiose, glycogen, inositol, 2- and 5-ketogluconate, D-lyxose, melibiose, β -methyl-xyloside, D-raffinose, L-rhamnose, sorbitol, L-sorbose, starch, xylitol and L-xylose.

nose, sorbitol and xylose. They were psychrotrophic as determined by their ability to form visible colonies at 7°C for 10 d, and non-aciduric, with end-pH values between 5.0 and 5.2 in MRS broth. They possessed an arginine dihydrolase activity. Due to a poor growth in MRS broth at pH 6.4, the isolates were therefore grown in Trypticase Soy Broth (TSB, Difco) at pH 7.4, supplemented with 0.6% (w/v) yeast extract (EB broth). Further tests, useful for the identification of the species of the genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, were done as described by Shaw and Harding (1985), Collins *et al.* (1987), Schillinger and Lücke (1987) and Montel *et al.* (1991).

Phenotypic tests. The carbohydrate fermentation patterns were also done with API 50 CHL galleries (API System, Montalieu-Vercieu, France) according to the manufacturer's instructions. The reactions were observed daily up to 5 d at 30°C. The ability to grow on Brain Heart Infusion (BHI; Difco), MRS and EB agar plates was observed at pH 5.0 and 7.2 and on Rogosa agar (Rogosa *et al.* 1951) at pH 5.5. For nitrate reduction, nutrient agar containing 0.2% (w/v) KNO₃ was used. The methyl red and Voges-Proskauer tests were done in Clark and Lubs broth (Difco). The presence of haemolysis was observed on

Columbia agar (Biokar) supplemented with 5% (v/v) sheep blood. H₂S production was tested in Kligler medium (Difco).

Chemotaxonomic tests. Enantiomers of lactic acid were determined in cell-free culture supernatant fluids with D(-) and L(+)-lactate dehydrogenases (Boehringer Mannheim, Germany). The detection of meso-diaminopimelic acid (meso-DAP) was done by the simplified procedure of Schleifer and Kandler (1972). For a quantitative determination, after derivatization with chloroformate, meso-DAP was analysed by GLC (Flame Ionization Detector, Delsi Nermag DN 250), according to the method of Debroas *et al.* (1993).

DNA-DNA hybridization. Chromosomal DNA was prepared by the procedures of Champomier *et al.* (1988) and Lonvaud-Funel *et al.* (1991). The chromosomal DNA from the six reference strains of *Carnobacterium* spp. and the eight reference strains of *Lactobacillus* spp. was labelled by random priming with the digoxigenin DNA Labelling and Detection Non Radioactive Kit (Boehringer Mannheim, Germany). DNA targets from the 36 isolates and the reference strains were spotted on a Zeta-Probe GT membrane

(Bio-Rad Laboratories, Richmond). Prehybridization and hybridization were done under stringent conditions ($5 \times \text{SSC}$, 68°C) in a WTB Binder oven (type BFED 53).

Antimicrobial compound production

Neutralized cell-free culture supernatant fluids of the 36 isolates and the six *Carnobacterium* reference strains were tested for the ability to produce antagonistic substances by the agar well diffusion method (Mayr-Harting *et al.* 1972) with $50 \mu\text{l}$ of sample.

RESULTS

Origin of the 'atypical lactobacilli'

The pH values of the five Brie cheeses were between 6.8 and 7.6 and no off-odours or organoleptic defects were noted. The 'atypical lactobacilli' flora were dominant in the five cheese samples, with counts between 10^8 and 10^9 cfu g^{-1} . The sources of the 36 *Lactobacillus*-type isolates are listed in Table 1. Six isolates were subcultured from PCA-agar after incubation at 7°C for 10 d and were representative of the psychrotrophic flora. The three isolates growing on Sierra agar and the two on milk-agar had neither lipolytic nor caseolytic activity.

Characterization of the *Lactobacillus*-type isolates

The 36 homofermentative isolates formed a phenotypically homogeneous group, clearly distinct from the lactobacilli. All were slender rods which occurred singly, in pairs or as short chains, with pairs of cells often bound by an angle forming a broad V-shape. Colonies on EB agar plates were non-pigmented, convex, shiny, smooth and circular. Cultures did not grow well in the upper part of the broth medium. No growth occurred on acetate agar at pH 5.5 (Rogosa medium) nor on BHI, MRS or EB agar media at pH 5.0, but all these media supported good growth at pH 7.2. Growth occurred in EB broth with 5% (w/v) NaCl, but not with 8% NaCl. Clot formation occurred in litmus milk at 30°C with no reduction of dye in the upper part of the medium. All produced the L-(+)-lactic acid enantiomer and contained meso-diaminopimelic acid in the peptidoglycan. A comparison of their biochemical characteristics with those of the four type-strains of the *Carnobacterium* species is shown in Table 2.

The results of the DNA-DNA hybridizations indicated that 33 of the 36 isolates were members of the species *C. piscicola* and three, all picked from the same cheese sample, members of the species *C. divergens* (Fig. 1). No hybridization was noted with labelled DNA from any of the other *Carnobacterium* spp. nor with labelled DNA from any of the *Lactobacillus* species tested.

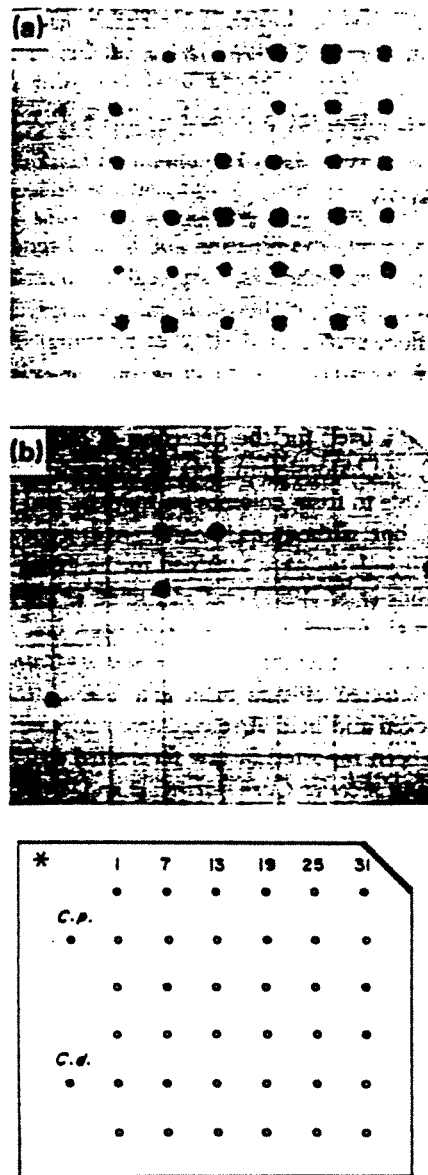


Fig. 1 Hybridization of 38 chromosomal DNA targets with two *Carnobacterium* DNA probes. Positions of DNA targets are shown on the picture. Dots 1 to 36 correspond to the chromosomal DNA targets from the 36 'atypical lactobacilli' from five Brie cheese samples. Dots *C.p.* and *C.d.* were respectively the DNA targets from the two reference type-strains, *C. piscicola* DSM 20730 and *C. divergens* DSM 20623. * Hybridizations were done with the two labelled DNA from the type-strains; (a) *C. piscicola* DSM 20730; (b) *C. divergens* DSM 20623

The ability to produce antagonistic substances against *Carnobacterium* spp. was found in 16 isolates from the five cheese samples and different spectra of inhibitory activity were noted. Six isolates from two cheese samples inhibited all six *Carnobacterium* reference strains, including strain *C. piscicola* DSM 20722, previously strain LV 61 (Shaw and

Harding 1985), known to produce a bacteriocin (Schillinger and Holzapfel 1990). *Carnobacterium piscicola* DSM 20730 and *C. divergens* DSM 20624 were the most susceptible strains. As expected, the producer strains were not affected.

DISCUSSION

In bacteriological examination of five French surface mould-ripened soft-cheeses, 'atypical lactobacilli' constituted the major part of the mesophilic and psychrotrophic lactic acid flora at the final stage of ripening. These non-aciduric isolates were able to grow on non-selective agar media (PCA, King B) but showed weak growth on the selective media used for the detection of lactic acid (MRS and Elliker) and halotolerant flora (TSB with added NaCl). They were able to form colonies on lipolytic and proteolytic agar plates, but without any visible hydrolytic enzymatic activities. All isolates were assigned to the genus *Carnobacterium* (Collins *et al.* 1987) and identified as the species *C. piscicola* and *C. divergens*.

Until now the members of the genus *Carnobacterium* have been detected only in meat and fish, especially when vacuum-packed and held at refrigerator temperatures. They have never been reported in raw fermented dairy products. This failure to recover *Carnobacterium* spp. from dairy products is probably due to the type of media used, i.e. MRS and acetate agar (Rogosa agar), both unsuitable for growth of carnobacteria. Fergus and Jones (1988) noted that none of the atypical lactobacilli of their phenons 9, 10 and 11 (group 2 of Thornley and Sharpe 1959) grew on MRS medium. Improvements in the detection of *Carnobacterium* spp. from products may be obtained on non-selective media with high pH values, between pH 8 and 9 (Holzapfel 1992), incubated under psychrotrophic conditions.

The antagonistic activity of 16 of the carnobacteria cheese isolates against *Carnobacterium* reference strains confirmed their close relationship to this genus, according to the definition of bacteriocins given by Tagg *et al.* (1976) and Klaenhammer (1988). Bacteriocin activity by carnobacteria has been reported previously (Schillinger and Holzapfel 1990) especially by the species *C. piscicola* isolated from meat products (Shaw and Harding 1985) and fish (Stoffels *et al.* 1992). Of the 16 bacteriocin producer isolates from the Brie cheese samples, isolate CP5 exhibited a bacteriocin-like activity against *Listeria* spp. (Mathieu *et al.* 1993). An inhibition of *Listeria* strains by carnobacteria has been reported recently (Ahn and Stiles 1990; Buchanan and Klawitter 1992).

All 36 *Carnobacterium* isolates from Brie cheese hydrolysed lactose with a β -galactosidase, and slowly clotted milk incubated at 30°C and 32 of them fermented galactose, thus indicating their adaptation to milk substrate and therefore their presence as natural spoilage flora in raw milk cheese.

It is probable that carnobacteria could constitute the major part of the natural psychrotrophic lactic acid flora of some refrigerated raw milks stored in farm tanks. In soft-cheese manufacture, their growth could increase during ripening, even at basic pH values of cheese, reaching high population levels at the end of the storage period. Moreover, new processing technologies, packaging and refrigerated storage of milk products and, for some isolates, the ability to produce bacteriocin could give some competitive advantages to carnobacteria. The original habitat of these bacteria is not known precisely and their growth, roles in the shelf-life and in the acceptability of food products are still to be defined. To date, there has been one study on the growth of one strain, LK 5, isolated from raw ground beef, in milk. No strong odour was detected in the milk (Buchanan and Klawitter 1992).

Studies are now in progress in our laboratory on the purification of the bacteriocin produced by isolate CP5, its biosynthesis and its action on a range of Gram-positive pathogenic and spoilage bacteria (Mathieu *et al.* 1993).

REFERENCES

- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 302-310.
- Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S. and Hetrick, F.M. (1991) Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3114-3120.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1992) Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK 5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in refrigerated foods. *Journal of Food Safety* 12, 219-236.
- Champomier, M.C., Montel, M.C., Grimont, F. and Grimont, P.A.D. (1988) Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sake*. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* 138, 751-758.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S. and Jones, D. (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 310-316.
- Debroas, D., Depardon, N. and Blanchart, G. (1993) A new method for determining 2-6 diaminopimelic acid in gut contents (personal communication).
- Elliker, P.R., Anderson, A.W. and Hannelsen, G. (1956) An agar culture medium for streptococci and lactobacilli. *Journal of Dairy Science* 39, 1611-1612.
- Fergus, S.B. and Jones, D. (1988) Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. *Journal of General Microbiology* 134, 1165-1183.
- Gibson, T. and Abd-el-Malek, Y. (1945) The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a

- culture method for detecting the process. *Journal of Dairy Research* 14, 35-44.
- Grant, I.R. and Patterson, M.F. (1991) A numerical study of lactic acid bacteria isolated from irradiated pork and chicken packaged under various gas atmospheres. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 302-307.
- Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J. and Fryer, J.L. (1984) *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 393-400.
- Holzappel, W.H. (1992) Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 17, 113-133.
- Holzappel, W.H. and Gerber, E.S. (1983) *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+)-lactate. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 522-534.
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986) Regular, non-sporing Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2, ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1208-1234. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. and Ledoux, O. (1991) Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 501-508.
- de Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130-135.
- Mathieu, F., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993) Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnology Letters* 15, 587-590.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. and Berkeley, R.C.M. (1972) Method for studying bacteriocins. In *Methods in Microbiology* Vol. 7a, ed. Norris, J.R. and Ribbons, D.W. pp. 315-422. New York: Academic Press.
- Møller, V. (1955) Simplified test for some aminoacid decarboxylases and for arginine dihydrolase system. *Acta Pathology and Microbiology* 36, 158-172.
- Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J. and Champomier, M.C. (1991) A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 469-472.
- Niemand, J.G. and Holzappel, W.H. (1984) Characteristics of lactobacilli isolated from radurised meat. *International Journal of Food Microbiology* 1, 99-110.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. and Wiseman, R.F. (1951) A selective medium from the isolation of oral and fecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology* 62, 132-133.
- Schillinger, U. and Holzappel, W.H. (1990) Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiology* 7, 305-310.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1987) Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology* 4, 199-208.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriology Review* 36, 407-477.
- Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1984) A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packaged beef, pork, lamb and bacon. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 25-40.
- Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1985) Atypical lactobacilli from vacuum-packaged meats: comparison by DNA hybridization, cell composition and biochemical tests with a description of *Lactobacillus carnis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 291-297.
- Sierra, G. (1957) A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cell and fatty acids. *Antonie van Leeuwenhoek* 23, 15-22.
- Stoffels, G., Nes, I.F. and Gudmundsdottir, A. (1992) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 309-316.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40, 722-756.
- Thornley, Y.M.J. and Sharpe, M.E. (1959) Micro-organisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic spore formers. *Journal of Applied Bacteriology* 22, 368-376.

PUBLICATION N°2

**PROPERTIES OF A BACTERIOCIN PRODUCED BY
Carnobacterium piscicola CP5**

MATHIEU. F., MICHEL. M., F. and LEFEBVRE, G.

Publiée dans
Biotechnology Letters
Vol. (15) N°6 (June 1993), pp 587-590

PRESENTATION DES TRAVAUX

Parmi les 33 isolats identifiés à l'espèce *C. piscicola*, l'isolat codé CP5 est retenu pour sa capacité à produire une substance antibactérienne contre d'autres carnobactéries isolées de différents fromages et des souches de *Carnobacterium* de référence. Les objectifs sont simples : savoir rapidement si l'agent antibactérien produit est une bactériocine et pouvoir estimer s'il est différent des bactériocines déjà connues au sein du genre *Carnobacterium* grâce à de premières caractéristiques déterminées sur des extraits bruts.

Pour s'assurer que l'inhibition observée sur les différentes souches de carnobactéries est bien due à la présence d'une bactériocine, il faut tout d'abord éliminer les éventuels "faux positifs" par deux tests : l'ajustement du surnageant de culture à un pH neutre (la forme dissociée de l'acide lactique est non toxique pour les cellules), l'ajout de catalase ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) qui détruit l'eau oxygénée éventuellement produite, qui pourrait être aussi une source d'inhibition. La méthode de détection est la méthode des puits qui consiste à creuser des puits de 5 mm de diamètre dans un milieu gélosé ($12\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ d'agar bactériologique) préalablement inoculé avec la souche cible choisie. $20\mu\text{l}$ de surnageant de culture ainsi préparés sont déposés dans le puits. Après une diffusion de 6 heures à 4°C et une incubation d'une nuit à la température de croissance de la souche cible, la présence d'une zone d'éclaircissement autour du puits démontre que ni l'acidité ni le peroxyde d'hydrogène ne sont responsables de l'inhibition. Le titre en bactériocine ($\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$) est donné par la méthode des puits par la dilution de l'échantillon de deux en deux. Une unité arbitraire d'activité correspond à l'inverse de la plus forte dilution pour laquelle une zone d'inhibition peut être mesurée (1mm de diamètre), la valeur est ramenée à 1 millilitre d'extrait.

L'étape suivante consiste à prouver la nature protéique de l'agent antibactérien. Pour cela, le surnageant de culture est traité 1 heure à 37°C par différentes enzymes protéolytiques, chacune étant ajoutée à une concentration finale de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'action éventuelle d'enzymes non protéolytiques (α -amylase, lipase, phospholipase, dextranase) est aussi recherchée. Pour chaque surnageant traité, ainsi que pour le témoin non traité, la présence ou l'absence d'activité sont détectées par la méthode des puits.

L'assurance d'être en présence d'une bactériocine amène à poursuivre le travail en établissant le spectre complet d'activité inhibitrice vis-à-vis d'autres espèces de bactéries lactiques, mais aussi vis-à-vis de bactéries contaminantes (*Enterococcus* par exemple) ou pathogènes (*Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus*). Il est possible également de déterminer les premières caractérisations de la bactériocine : conditions de production ; stabilité thermique ; stabilité à des pH variant de 2.0 à 10.0.

PRINCIPAUX RESULTATS

L'isolat *C. piscicola* CP5 produit une substance antibactérienne active contre d'autres carnobactéries incluant des souches sauvages et les souches de référence. L'action inhibitrice n'est supprimée ni par l'ajustement du pH du surnageant de culture à la neutralité, ni par l'addition de catalase. En revanche, elle est détruite après traitement du surnageant de culture avec des enzymes protéolytiques (sauf la protéase de type XIII) (Tableau 2). L'isolat *C. piscicola* CP5 produit donc une bactériocine qui a été nommée carnocine CP5.

La carnocine CP5 exerce une inhibition sur les genres *Enterococcus* et *Listeria* ainsi que sur une seule espèce du genre *Lactobacillus* : l'espèce thermophile *delbrueckii* (Tableau 1). Les autres représentants des lactobacilles thermophiles, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus* ne sont pas inhibés ainsi que les lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires. La carnocine CP5 n'a pas d'action sur les autres genres des bactéries lactiques : *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus*. Elle n'inhibe pas non plus les genres *Staphylococcus* et *Bacillus*.

La carnocine CP5 apparaît stable 15, 30 et 60 minutes à 100°C mais perd son activité après un cycle d'autoclavage de 15 minutes à 121°C (Tableau 2). La carnocine CP5 est stable sur une large gamme de pH de 2.0 à 10.0 ; au delà, l'activité est perdue. Par dialyse et ultrafiltration, le poids moléculaire de la carnocine CP5 dans le surnageant de culture est estimé supérieur à 10 kDa. Des études de croissance et de production de bactériocine indiquent une sensibilité de la souche à un pH acide : l'arrêt de croissance est observé pour un pH de l'ordre de 5.0 induisant une faible production de la carnocine CP5 dans le surnageant de culture (Fig. 1a). Un doublement de la biomasse et de la production sont observés par une régulation du pH à 7.0 par addition de NaOH, à 2.5 N (Fig. 1b).

PROPERTIES OF A BACTERIOCIN PRODUCED BY *Carnobacterium piscicola* CP5**MATHIEU F., MICHEL M. and LEFEBVRE* G.**Laboratoire de microbiologie industrielle et alimentaire, ENSAIA-INPL, 2, avenue de la forêt de Haye,
54500 Vandoeuvre, France.**SUMMARY**

Carnobacterium piscicola CP5 produced a bacteriocin named carnocin CP5 that inhibited *Carnobacterium*, *Enterococcus* and *Listeria* spp. and among the *Lactobacillus* spp. only *Lactobacillus delbrueckii* ssp.. Carnocin CP5 was stable 1h at 100°C at pH 7.0. It was inactivated by numerous proteolytic enzymes. Production of carnocin CP5 occurred in MRS broth regulated at pH 7.0. The apparent molecular weight of the bacteriocin in the crude extract was greater than 10 kDa, but around 5 kDa after action of SDS or urea. Novobiocin treatment led to non-producer variants.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria are known to produce several antimicrobial agents including organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins (Piard and Desmazeaud, 1992). Recently bacteriocin production was observed in the genus *Carnobacterium* spp. (Schillinger and Holzapfel, 1990 ; Ahn and Stiles, 1990 ; Ahn and Stiles, 1992 ; Stoffels *et al.*, 1992). The genus *Carnobacterium* spp. was proposed by Collins *et al.* (1987) for non-aciduric atypical lactobacilli isolated from poultry. But, Holzapfel and Gerber (1983), Hiu *et al.* (1984) and Shaw and Harding (1985) had already described these atypical lactobacilli isolated from vacuum packaged beef and salmonid fish respectively as *Lb. divergens*, *Lb. piscicola* and *Lb. carnis*. Previous results (Mathieu *et al.*, 1992) had shown that a non aciduric lactic acid bacterial isolate antagonized *Listeria* spp. strains. In the present paper, this isolate (CP5), thereafter identified as a *C. piscicola*, is reported to produce a bacteriocin which was characterized.

MATERIALS AND METHODS**Bacterial strains and media**

Several *Carnobacterium* spp. were isolated from different foodstuffs. Among these ones, the isolate CP5 was identified as a *C. piscicola* according to the simplified identification key proposed by Montel *et al.* (1992) using the carbohydrate utilization pattern, L-lactic acid production, presence of meso-diaminopimelic acid in the cell wall, activity of arginine dihydrolase and non-aciduric character. *C. piscicola* CP5 was propagated at 30°C in MRS (Biokar, s.a., France) broth with an initial pH adjusted to 7.0. *Carnobacterium* and *Listeria* strains used as indicators were cultured in tryptic soy (Biokar) broth supplemented with yeast extract (6 g.l⁻¹, Biokar). *Lactococcus* and *Enterococcus* strains were propagated in Elliker (Biokar) broth and *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* in MRS broth.

Bacteriocin detection and activity assay

Carnocin CP5 was detected by the agar well diffusion method (Tagg and Mac Given, 1971). A 20 µl portion of the cell-free supernatant fluid (at pH 7.0) was placed into a 5-mm agar well, cut in an indicator lawn, and allowed to diffuse for 6h at 4°C. For quantitative estimation of the inhibitory activity, serial two-fold dilutions of carnocin CP5 extracts were tested by the agar well diffusion method and the titer, expressed in arbitrary units per millilitre (AU.ml⁻¹), was defined as the reciprocal of the highest dilution showing a distinct inhibition zone after 16h at 30°C.

Production of carnocin CP5

C. piscicola CP5 was grown in MRS broth (initial pH adjusted at 7.0) in a fermentor (Mini fermentor LABO 2000, Interscience, Saint Nom, France) which was connected to an automatic pH controller to maintain pH at 7.0 with sterile 2.5 mol.l⁻¹ NaOH. Other cultures were made without pH regulation for comparisons. Samples were removed over a 24h period to follow both growth (absorbance at 660 nm) and bacteriocin production (AU.ml⁻¹).

Characteristics of carnocin CP5

To test the sensitivity of carnocin CP5 to proteolytic or non-proteolytic enzymes, cell-free supernatant fluid at pH 7.0 was incubated at 37°C for 1h with selected enzymes added at a final concentration of 1mg.ml⁻¹ (Table 2). Effect of catalase was also examined by treating the supernatant with catalase (1 mg.ml⁻¹) at 30°C for 1h.

Temperature stability of the bacteriocin was assessed by heating the cell-free supernatant fluid at pH 7.0 to 100°C for 15, 30 and 60 min and to 121°C for 15 min. Stability of bacteriocin at different pH was determined by adjusting the cell-free supernatant fluid at pH 2.0 to 10.0 with HCl 2 mol.l⁻¹ or NaOH 2 mol.l⁻¹ and incubating for 1h at 20°C. Before testing residual activity, the cell-free supernatants were readjusted to pH 7.0.

To estimate the apparent molecular weight (MW) of carnocin CP5, the cell-free supernatant fluid was dialyzed overnight at 4°C in dialysis seamless cellulose tubing (Union Carbide Corporation, Chicago, Illinois, 60638) with a 6-8 kDa cutoff, against an equal volume of distilled water, to avoid dilution. Bacteriocin activity was measured both inside and outside the tubing. Cell-free supernatant fluid was also ultrafiltered through a cellulose membrane (cutoff 10 kDa) with the Minitan-S apparatus (Millipore). Both ultrafiltrate and retentate were tested for bacteriocin activity. Gel filtration experiments were performed on Sephacryl S-200 (Pharmacia) column.

RESULTS AND DISCUSSION

The antimicrobial spectrum of the cell-free supernatant fluid, at pH 7.0, from a *C. piscicola* CP5 culture on MRS broth, during 14 h at 30°C, was established by the agar well diffusion method.

Table 1 : Inhibitory spectrum of the bacteriocin produced by *C. piscicola* CP5

	Indicator strains	Source a)	Sensitivity b)
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> 20079	DSM	-
	<i>acidophilus</i> 251	INRA	-
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 20081	DSM	+
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 369	INRA	+
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 551	IP	+
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 41C1	ENSAIA	+
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> 20074	DSM	+
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 20072	DSM	+
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 242	INRA	+
	<i>helveticus</i> 303	INRA	-
	<i>casei</i> ssp. <i>casei</i> 20011	DSM	-
	<i>casei</i> ssp. <i>casei</i> 383	INRA	-
	<i>curvatus</i> 20019	DSM	-
	<i>plantarum</i> 20174	DSM	-
	<i>plantarum</i> 432	INRA	-
	<i>sake</i> 20017	DSM	-
	<i>brevis</i> 20054	DSM	-
	<i>brevis</i> 423	INRA	-
	<i>büchneri</i> 20057	DSM	-
	<i>fermentum</i> 20052	DSM	-
<i>fermentum</i> 233	INRA	-	
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 11454	ATCC	-
	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i> A1, A3, A14, A 19, A33, B7, B22, B29, B31, 106, 127,	ENSAIA	-
	<i>lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 116	INRA	-
<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i> 20202	DSM	-
	<i>mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> 20240	DSM	-
	<i>mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> 20484	DSM	-
	<i>mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> 20346	DSM	-
	<i>paramesenteroides</i> 20288	DSM	-

<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i> 583	ENSAIA	-
	<i>cerevisiae</i> 5492	IP	-
	<i>pentosaceus</i> 532	ENSAIA	-
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i> 631	ENSAIA	+
	<i>faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i> 636	ENSAIA	+
	<i>faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> 5430	IP	+
<i>Listeria</i>	<i>grayi</i> 6818	IP	+
	<i>monocytogenes</i> 82110*	IP	+

a) ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, Md) ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Germany) ; IP, Institut Pasteur Collection (Paris, France) ; INRA, Institut National de Recherches Agronomiques (Paris, France) ; ENSAIA, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agro-alimentaires (Vandoeuvre, France).

b) Strains were considered sensitive when the size of the zone was larger than the diameter of the well (5 mm)

*Seven other strains were inhibited among eight tested

Among six strains of *Carnobacteria* spp. tested, all were inhibited, especially two strains of *C. piscicola* (results not shown). Inhibition was observed against all *Enterococcus* and *Listeria* spp. tested (Table 1). Among lactobacilli strains, carnocin CP5 was active only against the *Lb. delbrueckii* ssp.. Carnocin CP5 did not inhibit a wide variety of lactic acid bacteria including pediococci, lactococci and lactobacilli such as *Lb. sake* DSM 20017, *Lb. casei* DSM 20011 or *Lb. acidophilus* DSM 20079, strains which were inhibited by carnocin UI49 from *C. piscicola* UI49 (Stoffels *et al.*, 1992). The bacteriocin produced by *C. piscicola* LV61 (Schillinger and Holzapfel, 1990) was effective against *Lb. plantarum* DSM 20174 and also *Lb. sake* DSM 20017, contrary to carnocin CP5. Moreover, it was only a ten-fold concentrated supernatant fluid of *C. piscicola* LV61 which was active against *L. monocytogenes* by the agar well diffusion method. Ahn and Stiles (1990) reported an inhibitory action on *Pediococci* spp. by the bacteriocin produced by *C. piscicola* LV17. In addition carnocin CP5 inhibited *C. piscicola* DSM 20722 (identical to strain LV61). So Carnocin CP5 seemed to be different from known bacteriocins of *Carnobacterium* strains.

Like the other known bacteriocins of carnobacteria (Stoffels *et al.*, 1992 ; Ahn and Stiles, 1990), carnocin CP5 was inactivated by most proteolytic enzymes, except protease type XIII. Non-proteolytic enzymes tested did not cause inactivation (Table 2). Antagonistic activity was not affected by catalase action. So, hydrogen peroxide was not the inhibitory factor. The antagonistic activity was stable at pH 7.0 during heat treatment at 100°C for 15, 30 and 60 min, but was destroyed after autoclaving at 121°C for 15 min. The antagonistic substance was stable over the pH range 2.0 to 10.0 at 20°C during 1h.

Treatment	Activity*
control	+
catalase (Sigma, 3400 Umg ⁻¹ prot)	+
pronase E (Merck, 95000 PUKg ⁻¹)	-
proteinase K (Sigma, 9.1 Umg ⁻¹ prot)	-
trypsin (Serva, 39 Umg ⁻¹ prot)	-
α-chymotrypsin (Serva, 87 Umg ⁻¹ prot)	-
pepsin, pH 3.0 (Serva, 16 milliAnson Umg ⁻¹ prot)	-
ficin (Sigma, 0.5 Umg ⁻¹ prot)	-
thermolysine (Sigma, 57 Umg ⁻¹ prot)	-
protease XIII (Sigma, 0.4 Umg ⁻¹ solid)	+
α-amylase (Sigma, 2.2 Umg ⁻¹ prot)	+
dextranase (Sigma, 350 Umg ⁻¹ prot)	+
phospholipase A ₂ (Sigma, 770 Umg ⁻¹ prot)	+
phospholipase C (Sigma, 15.8 Umg ⁻¹ prot)	+
phospholipase D (Sigma, 106 Umg ⁻¹ prot)	+
lipase (Sigma, 4.865 Umg ⁻¹ prot)	+
100°C / 15 min	+
100°C / 30 min	+
100°C / 60 min	+
121°C / 15 min	-

Table 2 : Effect of enzymes and heat on cell-free supernatant fluid from *C. piscicola* CP5

*Activity determined by the agar well diffusion method using *Listeria monocytogenes* IP 82110 as an indicator organism. (+, presence and - loss of activity). Final enzyme concentration = 1mg.ml⁻¹

The inhibitor was precipitated in presence of ammonium sulfate (40% of saturation). Estimation of MW of carnocin CP5 by dialysis, ultrafiltration and gel filtration studies showed that in a crude extract carnocin CP5 had an apparent MW between 10 and 30 kDa. In denaturing conditions (SDS-PAGE or gel filtration with 8M urea) the apparent MW of the dissociated form was found to be around 5 kDa (data not shown).

C. piscicola CP5 did not well grow on MRS broth adjusted to an initial pH of 6.0. This observation was in accordance to the characteristics of the genus *Carnobacterium* spp. that grouped non aciduric lactic acid bacteria (Collins *et al.*, 1987). In MRS broth adjusted to a starting pH of 7.0 (Fig. 1a), growth of *C. piscicola* CP5 at 30°C resulted in a detectable amount of carnocin CP5 in the supernatant fluid already after 4h.

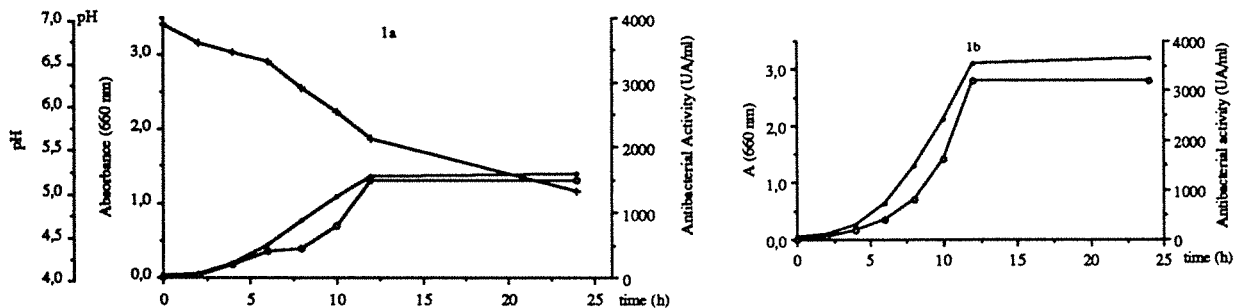


Figure 1 : Growth of *C. piscicola* CP5 (•) and production of carnocin CP5 (o) in MRS broth adjusted at initial pH (+) 7.0 (1a) or regulated at pH 7.0 during the growth (1b)

Both growth and production stopped after 12h as soon as the pH was 5.5, reaching respectively 1.36 units of absorbance and 1500 AU.mL⁻¹. Therefore, growth and production kinetics were performed on MRS broth regulated at pH 7.0 (Fig. 1b). Thus, growth and production reached respectively 3.1 units of absorbance and 3200 AU.mL⁻¹ after 12h. Contrary to the results obtained by Stoffels *et al.* (1992) with carnocin UI49, a good production of carnocin CP5 was also obtained during growth at 4°C during seven days (not shown).

Curing experiments with novobiocin (10 mg.l⁻¹) had led to the obtention of variants which had lost both characters of bacteriocin production and immunity to the parental bacteriocin. Experiments are now conducted to study the genetic determinism of the biosynthesis of carnocin CP5. In addition, applications of carnocin CP5 for inhibiting *Listeria* strains in foodstuffs are investigated.

REFERENCES

- Ahn, C., and Stiles, M.E. (1990). *J. appl. Bact.* **69**, 302-310
 Ahn, C., and Stiles, M.E. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2503-2510.
 Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S., and Jones, D. (1987). *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 310-316.
 Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J., and Fryer, J.L. (1984). *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 393-400.
 Holzappel, W.H., and Gerber, E. (1983). *System. Appl. Microbiol.* **4**, 522-534.
 Mathieu, F., Sudirman, I., Benoit, V., Rekhif, N., Michel, M., and Lefebvre, G. (1992). 3ème Congrès Société française de Microbiologie, 21-24 avril, Lyon France.
 Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J., and Champomier, M.C. (1991). *J. Appl. Bact.* **70**, 469-472.
 Piard, J.C., and Desmazeaud, M. (1992). *Lait* **72**, 113-142.
 Schillinger, U., and Holzappel, W.H. (1990). *Food Microbiol.* **7**, 305-310.
 Shaw, B.G., and Harding, C.D. (1985). *System. Appl. Microbiol.* **6**, 291-297.
 Stoffels, G., Nes, I.F., and Guomundsdottir, A. (1992). *J. Appl. Bact.* **73**, 309-316.
 Tagg, J.R., and Mc Given, A.R. (1971). *Appl. Microbiol.* **21**, 943.

PUBLICATION N°3

**Characterization and plasmid-linkage of carnocin CP5, an anti-Listeria
bacteriocin produced by Carnobacterium piscicola CP5**

MATHIEU, F., MATHIS, R., LEBRIHI, A. and LEFEBVRE, G.

Publication en préparation

PRESENTATION DES TRAVAUX

Des améliorations à la fois dans la production et dans la détection de la bactériocine carnocine CP5 ont été nécessaires avant de mieux la caractériser :

* Par des études préalables (non présentées ici), les conditions de production ont été améliorées avec la croissance de l'isolat *C. piscicola* CP5 sur un milieu MRS dilué une fois (appelé 1/2 MRS), supplémenté en extrait de levure (2.5 g.l^{-1}) et en Tween 80 (0.5 ml.l^{-1}).

* La détection de l'activité antibactérienne se fait selon la méthode des puits. La souche cible choisie est *L. monocytogenes* ATCC 15313, le milieu de croissance est le milieu N°1 pour antibiotiques de l'Institut Pasteur dont la quantité d'agar bactériologique est passée de 12 g.l^{-1} à 8 g.l^{-1} seulement. De plus, le détergent Tween 80 y est ajouté à raison de 2 ml.l^{-1} . La diffusion, initialement de 6 heures, a été augmentée jusqu'à une nuit à 4°C . La lecture des zones d'inhibition se fait après 7 heures d'incubation à 37°C .

L'approfondissement de nos connaissances sur la carnocine CP5 a été envisagé dans plusieurs domaines :

⇒ Domaine physicochimique :

* Estimer de façon précise le PM apparent de la carnocine CP5 native par chromatographie de filtration sur gel d'un surnageant de culture brut, et d'un surnageant de culture traité avec un agent dénaturant, l'urée, à une concentration finale de 8M.

* Préciser le seuil de précipitation de la carnocine CP5 lors de l'addition de sulfate d'ammonium dans un surnageant de culture. Par une technique électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), une nouvelle estimation du PM a pu être envisagée sur un précipité au sulfate d'ammonium.

* Observer le "comportement" chromatographique de la carnocine CP5, précipitée au sulfate d'ammonium, sur des résines échangeuses d'ions, de type cationique (colonne en polypropylène, Econo-Pac S, Bio-Rad, ayant une matrice dont les groupements fonctionnels sont de type sulfonate (SO_3^-) donnant un caractère acide fort) et anionique (colonne Econo-Pac Q, Bio-Rad, ayant une matrice dont les groupements sont

de type triméthylammonium donnant un caractère base forte) et sur une résine faiblement hydrophobe dont la phase stationnaire porte des groupements méthyle (CH₃). Sur cette dernière, un extrait issu de la précipitation au sulfate d'ammonium et un extrait contenant de l'urée à une concentration finale de 8M ont été testés.

⇒ Domaine génétique :

L'aspect génétique de la production de la carnocine CP5 est abordé par la recherche de mutants non producteurs à la suite de la croissance de la souche mère sur un milieu contenant un agent curant, la novobiocine. Le screening des clones non producteurs est réalisé contre deux souches de lactobacilles thermophiles *Lb. delbrueckii* var. *delbrueckii* DSM 20074 et *Lb. delbrueckii* var. *bulgaricus* INRA 369 mais non contre *L. monocytogenes* ATCC 15313. En effet, lors de la récupération du clone supposé non producteur, il peut être contaminé avec la souche cible. Le milieu sur lequel sera striée la colonie doit donc empêcher la croissance de cette souche cible au profit de la colonie non productrice. Des essais préliminaires (non présentés ici) ont montré des facilités de discrimination entre une carnobactérie et un lactobacille thermophile qui sont plus difficile à obtenir avec une listéria. Les clones récupérés sont vérifiés par la suite être non inhibiteurs de *L. monocytogenes* ATCC 15313.

⇒ Mode d'action :

Le mode d'action de la carnocine CP5 est envisagé par la technique de co-culture entre *C. piscicola* CP5 et *L. monocytogenes* ATCC 15313. Le milieu de co-culture est le milieu EB, la température d'incubation est 7°C. L'obtention d'un mutant non producteur sert de témoin à l'expérience.

PRINCIPAUX RESULTATS

Le PM apparent de la carnocine CP5 native dans un surnageant de culture est estimé à environ 30 kDa (Fig.1a.) alors que dans un surnageant de culture contenant de l'urée 8M, il est estimé inférieur à 6 kDa (Fig.1b.). Dans un extrait précipité à 40% de saturation en sulfate d'ammonium, le PM apparent de la carnocine CP5 dissociée, estimé par SDS-PAGE, est d'environ 3 kDa (Fig.2. et Fig.3.).

Lors de l'addition de sulfate d'ammonium en poudre à un surnageant de culture, la carnocine CP5 précipite dès 20% de saturation mais avec un faible rendement. Le pourcentage de saturation qui entraîne la précipitation complète de la carnocine CP5 n'est pas bien défini, puisque jusqu'à 80% de saturation, de l'activité est encore détectée (Tableau 1).

La carnocine CP5 n'a pas pu être purifiée sur colonne échangeuse d'ions. En effet quel que soit l'échangeur, anionique ou cationique, la carnocine CP5 ne s'accroche pas sur le support dans les conditions de pH que nous avons essayées et est éluée pendant le lavage de la colonne.

L'interaction de la carnocine CP5 avec une phase hydrophobe (Fig.4.) se traduit par 2 pics d'activité : le premier correspond à une fraction de la carnocine CP5 qui ne s'accroche pas sur le support. Ce pic est obtenu lors du lavage de la colonne avec un tampon à forte concentration ionique. Le second pic correspond à une fraction de la carnocine CP5 qui est retenue sur le support hydrophobe, puis éluée à 0.3M de sulfate d'ammonium. La présence d'urée dans l'extrait favorise l'accrochage de la carnocine CP5 sur le support. La fraction non accrochée n'est pas due à un phénomène de saturation de la colonne, puisque le dépôt du même extrait sur une colonne à plus grosse capacité conduit également à ces deux pics d'activité (résultats non montrés).

Les expériences de cure d'ADN plasmidique par la croissance de l'isolat *C. piscicola* CP5 sur un milieu contenant de la novobiocine ont permis d'isoler deux mutants non producteurs et sensibles à la carnocine CP5 : les variants VCP51 et VCP52. L'analyse du profil d'ADN plasmidique révèle chez la souche parentale la présence de 8 bandes plasmidiques notées de pML1 à pML8, chez le variant VCP51 la perte du plasmide pML6 et chez le variant VCP52, la perte des plasmides pML2, pML4 et pML6 (Fig.5.).

L'isolat *C. piscicola* CP5 associé à *L. monocytogenes* ATCC 15313 dans un milieu EB à 7°C induit en 48 heures une réduction de 4 logs de la population de *L. monocytogenes* par rapport à sa population en culture pure au même moment. Au bout de 7 jours, on ne détecte plus aucune listéria dans le milieu et ce jusqu'à 21 jours de co-culture. L'effet bactéricide est lié à la production de la carnocine CP5 dans le milieu puisque la co-culture VCP52-*L. monocytogenes* n'engendre pas d'effet bactéricide (Fig.6.).

Characterization and plasmid-linkage of carnocin CP5, an anti-Listeria bacteriocin produced by Carnobacterium piscicola CP5

MATHIEU, F.^a, MATHIS, R.^a, LEBRIHI, A.^a and LEFEBVRE, G.^a

^aLaboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire.

ENSAIA-INPL, 2 Avenue de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre les Nancy France

Tel : 83.59.58.81. Fax : 83.59.58.04

Correspondence address : G. Lefebvre, Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire

ENSAIA-INPL, 2 Avenue de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

Summary

One isolate identified as Carnobacterium piscicola CP5, isolated from a french mould-ripened soft-cheese, was found to produce an antibacterial compound. Antibacterial spectrum was limited to other Carnobacterium strains, Lactobacillus delbrueckii ssp., Enterococcus spp. and Listeria spp. According to the preliminary characteristics, this antibacterial compound was a bacteriocin-like substance, named carnocin CP5. Carnocin CP5, in crude extract, showed a molecular weight around 30 kDa, while under denaturing conditions due to the presence of urea or SDS, carnocin CP5 molecular weight was around 3-4 kDa. On anion exchange column at pH 8.4 or on cation exchange one at pH 4.2, carnocin CP5 did not interact with these resins. It seems to behave like a non charged compound. Its hydrophobic nature was proved by two facts : a precipitation by weak concentration of ammonium sulfate since 20% ammonium sulfate saturation and its behaviour on a hydrophobic interaction column. Curing studies led to the obtention of variants those have lost the capacity to produce carnocin CP5 and those were becomen sensitive to the parental bacteriocin. By plasmid profil analysis, it could be reliable to the absence of one plasmid. C. piscicola exerted a bactericidal effect on Listeria monocytogenes ATCC 15313 in associated culture.

Introduction

In food products, lactic acid bacteria played an important hygienic role by the synthesis of a variety of inhibitory compounds that prevented the development of undesirable or pathogenic bacteria. These inhibitory compounds involved organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins, defined as small bactericidal proteins, generally active against closely related species (Tagg et al. 1976). Bacteriocin production has been encountered in various lactic acid bacteria (Klaenhammer 1988 ; Piard and Desmazeaud 1992 ; Nettles and Barefoot 1993). A recent interest concerned the discover of new anti-Listeria bacteriocins (Hécharde et al. 1993). In the genus Carnobacterium, some bacteriocins inhibited Listeria spp. (Buchanan and Klawitter 1992 ; Schillinger and Holzappel 1990 ; Ahn and Stiles 1990). Among those bacteriocins, some were produced by Carnobacterium strains isolated from meat (Shaw and Harding 1984 ; Buchanan and Klawitter 1992). An other bacteriocin, carnocin UI49 was characterized, it was produced by Carnobacterium piscicola UI49, isolated from fish but it did not antagonize Listeria spp. (Stoffels et al. 1992a). Purification experiments and amino acid sequences were reported for carnocin UI49 (Stoffels et al., 1992b) and for carnobacteriocin A (Worobo et al., 1993) and B (Quadri et al., 1993).

A preliminary study (Mathieu et al., 1993b) demonstrated the bacteriocin production by C. piscicola CP5, isolated, for the first time, from a French mould-ripened soft-cheese (Millière et al., 1994). The bacteriocin named carnocin CP5 antagonized Listeria spp. (Mathieu et al., 1994). This study was carried out to determine characteristics and plasmid-linkage of carnocin CP5.

Material and methods

Bacterial strains and media

Carnobacterium piscicola CP5, isolated from french surface mould-ripened cheese (Millière et al. 1994) was propagated at 30°C in MRS broth (Biokar, s.a., France) with an initial pH adjusted to 7.0. Listeria monocytogenes ATCC 15313, used as indicator strain, was propagated at 37°C in tryptic soy broth (Biokar) supplemented with yeast extract (6 g.l⁻¹, Biokar). This medium was named TSYE. Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii DSM 20074 and Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus INRA 369 were propagated in MRS broth. All these bacterial strains were maintained frozen at -20°C and were propagated twice, in broth media, before experimental use.

Carnocin CP5 production

Carnocin CP5 production was improved by controlling the pH of the medium, in a fermentor (Mini fermentor, Labo 2000, Interscience, Saint Nom, France) (Mathieu et al. 1993b). For purification experiments, 1/2 MRS broth supplemented with 0.5 ml.l⁻¹ Tween 80 (Merck) and 2.5 g.l⁻¹ yeast extract was inoculated with 2% (v/v) of an in the daytime pH-regulated culture of C. piscicola CP5. Broth pH was adjusted initially at pH 7.0 and maintained at this value during 12h with 2.5 M sodium hydroxide. Temperature was held at 30°C and agitation set at 100 rpm. Cell free supernatant fluid was obtained by removing bacteria by centrifugation (5000 g, 15 min).

Bacteriocin detection

Bacteriocin was detected by the agar well diffusion method, inoculating 1% of L. monocytogenes ATCC 15313 culture in a soft agar (0.8% bacteriological agar, Biokar) medium IP Pasteur Production (Mathieu et al. 1993a) supplemented with 2 ml.l⁻¹ Tween 80 and poured in Petri dishes. Wells, 5 mm in diameter, were cut in the soft agar plate and filled with 20 µl of test samples. Plates were allowed to diffuse one night at 4°C and then incubated at 37°C for at least 10h. Inhibition zones were examined and inhibition diameter was measured.

Bacteriocin assay

Carnocin CP5 activity was estimated by the critical dilution method and expressed in arbitrary units per millilitre (AU.ml⁻¹) according to Mathieu *et al.* (1993b).

Gel filtration experiments

In order to estimate the molecular weight (MW) of carnocin CP5 present in the cell free supernatant fluid, low pressure gel chromatography was conducted on a column (1x100 cm, Biorad, Richmond, USA) packed with Sephacryl S-200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden). That column had been equilibrated previously in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. Molecular weight markers, dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 were : dextran blue, ca 2 MDa ; bovine serum albumin (BSA) 66 kDa ; carbonic anhydrase 29 kDa ; cytochrome c, 12.4 kDa and aprotinin 6.5 kDa. A cell free supernatant fluid treated with 8 M urea (Prolabo) was further applied on the S-200 column.

In those two cases, fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹ and tested for inhibitory activity against L. monocytogenes ATCC 15313.

Ammonium sulfate precipitation

350 ml of concentrated cell free supernatant fluid were submitted to a fractionated ammonium sulfate precipitation at 20, 40, 60 and 80% ammonium sulfate saturation (wt/v). Once solid ammonium sulfate was added, the mixture was gently stirred for 1h at 4°C. The precipitates were collected after centrifugation (45 min, 20000 g, 4°C), resuspended in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 and dialysed against distilled water, overnight, at 4°C, in dialysis seamless cellulose tubing (Union Carbide Corporation, Chicago, Illinois 60638) with a 6-8 kDa cut-off. Bacteriocin activity was assayed by the agar well diffusion method against L. monocytogenes ATCC 15313. Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) with BSA (Sigma) as standard.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Carnocin CP5, present in the 40% ammonium sulfate precipitate fraction, was examined on polyacrylamide gel in the presence of 0.1% SDS (Sigma) as described by Laemmli (1970). In the stacking gel, polyacrylamide and N', N'-methylene-bisacrylamide concentrations were 5% and 1,25%, respectively. In the separating gel, concentrations were 17% for acrylamide and 0,45% for bisacrylamide. Electrophoresis was conducted at a

constant current of 200 V for 45-60 min (mini-Protean II apparatus, Biorad). After that, vertical gel was removed and cut in two parts. One half was stained with silver stain (Sigma) while the other half was assayed for antimicrobial activity against L. monocytogenes ATCC 15313 by the direct method described by Bhunia et al. (1987). To estimate molecular weight of carnocin CP5 in such denaturing condition, molecular weight standards were from two types. One was a mixture of six high molecular proteins standards from 94000 to 14400 Da (Pharmacia) and the other one was a mixture of four peptides spanning molecular weights of 21500 to 3400 Da (Combithek, Boehringer Mannheim, GmbH-biochemica).

Ion exchange chromatography

Two ml, resulting from the 40% ammonium sulfate fraction, were applied either to a 5 ml Econopac Q (Biorad) anion exchange cartridge column or to a 5 ml Econopac S cation exchange cartridge column (Biorad). These two cartridge columns were equilibrated respectively with 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.4 and with 50 mM citrate buffer pH 4.2 (starting buffer) at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Each column was then washed with 20 ml of the starting buffer, followed by a 60 ml linear NaCl gradient (0-1 M) in the same buffer. Fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ and tested for carnocin activity by the agar well diffusion method against L. monocytogenes ATCC 15313. Protein concentrations were followed by measurement absorption at 280 nm (Econo System, Biorad).

Hydrophobic interaction chromatography

Two ml of the 40% ammonium sulfate fraction, supplemented with 0.1 M ammonium sulfate, were loaded onto a 5 ml Econopac HIC cartridge column (Biorad), where the stationary phase contained methyl group. This column was equilibrated with 2 M ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 (starting buffer) at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ and then washed with 45 ml of the starting buffer, followed by a rapid decreasing ammonium sulfate gradient (2-0.3 M) within 3 min, then by a stand-by at 0.3 M ammonium sulfate during 15 min and finally by an ammonium sulfate gradient decreasing from 0.3 M to 0 M, within 5 min. Fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ and tested for carnocin activity by the agar well diffusion method against L. monocytogenes ATCC 15313. Proteins were followed by measurement of absorption at 280 nm (Econo System, Biorad). A further experiment using a bacteriocin sample treated with 8 M urea was conducted in the same way as above.

Plasmid curing experiments and mutants screening

Selection of variants that failed to exhibit carnocin CP5 activity was accomplished by novobiocin (Sigma) using as a plasmid-curing agent. Approximately 10^5 cfu.ml⁻¹ of C. piscicola CP5 were inoculated in 10 ml TSYE broth, containing 5, 10, 15, 20 or 25 mg.ml⁻¹ of a sterile solution of novobiocin. As a control a 10 ml TSYE broth without novobiocin was inoculated. After one night at 30°C, TSYE agar (1.5% bacteriological agar) was inoculated with appropriate dilutions (10^{-3} - 10^{-4}) of these cultures and poured in Petri dishes. After incubation at 30°C during 48h, only plates containing about 60 colonies were overlaid with 10 ml of soft MRS agar (0.7%) seeded with 1% of an overnight culture of the indicator strain Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii DSM 20074 or Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus INRA 369. After incubation overnight at 37°C, colonies that did not produce carnocin CP5 were detected by their inability to form inhibition zones. The agar was first flipped from the base plate into the cover and those colonies were picked with a sterile needle, streaked on TSYE agar plates (1.5% agar) in which mannitol took place of glucose. Such condition did not allow the growth of the two strains of Lactobacillus. Presumed variants were then inoculated in TSYE broth and loss of bacteriocin activity was checked by the agar well diffusion method. Moreover, variants were tested for their resistance or sensitivity to the parental bacteriocin. Variant identification was examined by Gram stain, catalase production and carbohydrates fermentation by using the API 50 CH identification kit.

Plasmid isolation

C. piscicola CP5 and variants were grown in 10 ml TSYE broth overnight at 30°C. A 4 ml sample of each culture was centrifuged at 6000 g for 10 min. The cells were resuspended in 3 ml of fresh TSYE broth and incubated 2h at 30°C. Cells were then harvested by centrifugation and plasmid DNA isolation procedure began. Plasmid DNA isolation was performed by the method of Klaenhammer (1984) with few modifications such as lysozyme concentration of 10 mg.ml⁻¹. To check plasmid extraction, electrophoresis was conducted on 0.6% agarose (Sigma) horizontal slab gels in Tris-Borate-EDTA buffer (0.089 M ; 0.089 M ; 0.002 M) at pH 8.0, using a constant current of 60V during 5h. Ethidium bromide (1mg.ml⁻¹) was added into the gels which were thereafter visualized under ultra-violet light (312 nm) using a transilluminator table (Bioblock). Photographs were taken with a 665 Polaroid film. Purified supercoiled DNA ladder (Bethesda, Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) was used as a standard for molecular weight approximations.

Growth of L. monocytogenes ATCC 15313 in associated culture with C. piscicola CP5 or with the variant VCP52.

Mode of action of carnocin CP5 on Listeria strain was studied using the co-culture method. C. piscicola CP5 and L. monocytogenes ATCC 15313 were cultured together in TSYE broth at 7°C, and each of them was cultured separately for control. The associated culture L. monocytogenes ATCC 15313 with the non bacteriocin producer variant VCP52, in TSYE broth at 7°C, was also followed to determine whether other parameters could be reliable to Listeria inhibition. Listeria strain was inoculated in 100 ml TSYE broth at a level of 10^4 CFU.ml⁻¹. The producer strain and the variant VCP52 were inoculated at a level of 10^6 CFU.ml⁻¹. Samples were taken at different time intervals to determine cell growth by plate counts. L. monocytogenes ATCC 15313 was enumerated on Listeria Selective Medium (Oxford, Oxoid) after incubation for 48h at 37°C. C. piscicola CP5 and VCP52 were enumerated on TSYE agar, after incubation for 48h at 30°C.

Results

Molecular weight of carnocin CP5

Preliminary studies with the cell free supernatant fluid, using either dialysis, in seamless cellulose tubing with a 6-8 kDa cut-off, or ultrafiltration (Minitan apparatus, Millipore) through a cellulose membrane with a 10 kDa cut-off, had shown that carnocin CP5 apparent MW, in crude extract, was higher than 10 kDa (Mathieu et al., 1993b). Permeation gel chromatography of concentrated supernatant fluid on a descending Sephacryl S-200 column resulted in a one single peak of carnocin CP5 activity. The elution volume corresponded to an apparent MW of about 30 kDa (Fig. 1a). Further experiment was conducted in the same above conditions using a concentrated cell free supernatant fluid sample treated with urea, a dissociating agent, added at a final concentration of 8 M. Thus carnocin CP5 activity was recovered in a one single peak having an elution volume corresponding to a MW slightly lower than 6.5 kDa (Fig. 1b). Urea at a concentration of 8 M did not inhibit the indicator organism L. monocytogenes ATCC 15313.

Ammonium sulfate precipitation and SDS-PAGE

After fractionated ammonium sulfate precipitation, carnocin CP5 activity was recovered in the fractions 0-20%, 20-40% and 40-60% saturation of ammonium sulfate (wt/v) (Table 1). There was not really a specific percentage of ammonium sulfate that precipitated the majority of bacteriocin activity. Moreover recovering yields were rather weak. However, the two fractions 0-20% and 20-40% lead to the best increase in specific activity. Thus, these two fractions were grouped and examined on SDS-PAGE to visualize contaminating proteins and to determine, at this step and under denaturing conditions due to the presence of 0.1% SDS, the MW of carnocin CP5. The part of SDS-PAGE gel, silver-stained, showed that partially purified carnocin CP5 contained numerous contaminating proteins (Fig. 2). The other half of the SDS-PAGE gel, overlaid with soft agar seeded with *L. monocytogenes* ATCC 15313, that permit direct detection of antibacterial activity, showed that the apparent MW could be estimated to be around 3 to 4 kDa. Other protein bands did not show antimicrobial property (Fig. 3).

Ion exchange chromatography

Attempts to adsorb carnocin CP5, resulting from the 40% ammonium sulfate precipitation, to a cation exchange resin (Econopac S, Biorad) at pH 7.0 or at pH 4.5 were unsuccessful (results not shown). Moreover, attempts to adsorb carnocin CP5 to an anion exchange resin (Econopac Q, Biorad) at pH 7.0 or 8.4 were also unsuccessful. Bacteriocin activity was always recovered in the first fractions during the washing of the column and not at all during the linear NaCl increasing concentration gradient.

Hydrophobic character

Hydrophobic interaction chromatography of the 40% ammonium sulfate precipitation lead to the recovery of bacteriocin activity in two distinct peaks. A part of carnocin CP5 activity was not retained on the Econopac HIC column and was recovered in the first fractions during the washing of the column at 2 M ammonium sulfate. The other part of bacteriocin activity was retained on the resin at this high ionic strength. Previous results (data not shown) reported that carnocin CP5 activity could be desorbed at around 0.3 M ammonium sulfate by decreasing the ionic strength using a linear gradient from 2 M to 0 M ammonium sulfate. Further experiments were also improved by desorbing carnocin CP5 activity at a stand-by at 0.3 M ammonium sulfate. Under denaturing conditions, due to the urea treatment of bacteriocin sample, and using a stand-by at 0.3 M ammonium sulfate,

adsorption/desorption of carnocin CP5 activity on Econopac HIC resin was improved (Fig. 4).

Plasmid curing experiments

C. piscicola CP5 was screened for the occurrence of Bac⁻ variants, that failed to exhibit carnocin CP5 activity, following a treatment with novobiocin. This procedure led to a selection of two Bac⁻ variants VCP51 and VCP52 those did not produce carnocin CP5 neither against the two strains of Lactobacillus delbrueckii nor against L. monocytogenes ATCC 15313. After repetitive transfers in TSYE broth without novobiocin, both have definitively lost the capacity to produce carnocin CP5. Moreover, both were sensitive to the bacteriocin produced by the parental strain. By examining their carbohydrates fermentation pattern and their antibiograms, no difference was reported. Plasmid analysis revealed that the original carnocin CP5 producing strain (Bac⁺) harboured eight distinct plasmidic bands from 6 to > 20 kpb. These plasmids are designated pML1 to pML8 (Fig. 5). The pML2, pML4, and pML6 plasmids were missing from the Bac⁻ variant VCP52, while only the pML6 plasmid was missing from the Bac⁻ variant VCP51.

Associated cultures

After 48h of associated culture with C. piscicola CP5, at 7°C, in TSYE broth, a reduction of 4 log cycles in the Listeria population was observed in comparison with the Listeria population level in the pure culture. After a 5 days coculture and until a 21 days one, L. monocytogenes population was reduced to a non detectable level whereas in pure culture, it attained 10⁹ CFU.ml⁻¹. This reduction in the viable count cells of Listeria did not occur in the coculture with the variant VCP52 (Fig. 6).

Discussion

Previous study (Mathieu et al. 1993b) showed that C. piscicola CP5 produced an extracellular compound, that antagonized closely related species (other Carnobacterium strains) and Listeria spp.. According to the preliminary characteristics such as inactivation by protease treatment, heat and pH stability, production study, this antimicrobial compound was according to Tagg et al. (1976), a bacteriocin-like substance that we named carnocin CP5.

Analysis performed on a concentrated supernatant fluid indicated that crude carnocin CP5 existed in the form of aggregates. The approximate MW of carnocin CP5 aggregates was in the range of 30-50 kDa, as determined by gel filtration. However, gel filtration chromatography conducted in denaturing conditions after urea (8 M) treatment of carnocin sample, demonstrated the existence of bacteriocin in the form of monomers having a MW lower than 6.5 kDa. The existence of carnocin CP5 in the form of monomers was confirmed after SDS-PAGE of a 40% ammonium sulfate precipitation. Self aggregation of bacteriocin molecules or aggregation with other proteins, yielding active high MW moieties, further dissociated into smaller active units under denaturing conditions, was also reported for other bacteriocins produced by lactic acid bacteria (Mortvedt et al. 1991 ; Muriana and Klaenhammer 1991 ; Benoit et al. 1993 ; Sudirman et al. 1993). Among bacteriocins produced by Carnobacterium spp. (Ahn and Stiles 1990 ; Buchanan and Klawitter 1992 ; Schillinger and Holzapfel 1990 ; Stoffels et al. 1992b) no precision about this phenomenon was mentioned.

Carnocin CP5 activity was precipitable by addition of solid ammonium sulfate since 20% ammonium sulfate saturation. Besides carnocin CP5, lactocin S (Mortvedt et al. 1991) precipitated also at this value. But, the majority of bacteriocins precipitated at a higher percentage of ammonium sulfate saturation such as 40% like lactacin F (Muriana and Klaenhammer 1991), bavaricin A (Larsen et al. 1993), and carnocin UI49 (Stoffels et al. 1992b) or such as 60% like lactacin 481 (Piard et al. 1992) or 70% like leucocin A-UAL 187 (Hastings et al. 1991). In our case, a relative low yield was obtained. This can be explained by the heterogeneous form of carnocin CP5, aggregate or monomer, inducing difficulties to precipitate the total activity at a determined ammonium sulfate concentration. This problem was also reported by Van Laack et al. (1992) to purify carnosin, a bacteriocin produced by Leuconostoc carnosum LA 44A. Nevertheless, to determine some characteristics of carnocin CP5, the fraction 40% ammonium sulfate precipitation was loaded either onto ionic exchange column or onto hydrophobic one.

When applying carnocin CP5 resulting from 40% ammonium sulfate precipitation to anionic or cationic exchange column, the bacteriocin was never adsorbed on those both resins. Conditions used permitted to collect carnocin CP5 activity in the washing buffer. This behaviour can be explained by the presence of carnocin CP5 in the form of aggregates those gave to the molecule a particular form hiding ionic sites. When a 40% ammonium sulfate fraction was submitted to a non denaturing gel electrophoresis (7% acrylamide), without SDS, direct detection of anti-Listeria activity permitted to verify that carnocin CP5 did not migrate in the electric field (data not shown). Carnocin CP5 behaved like an

apparent non charged compound. In this respect, carnocin CP5 differed from carnocin UI49 (Stoffels et al. 1992b) that was adsorbed on a S-Sepharose cation exchange column and eluted with 0.2 M NaCl in 20 mM glycine NaOH buffer, pH 9.2.

The hydrophobic nature of carnocin CP5 was evidenced by two facts. First, carnocin CP5 was precipitated with a low concentration of ammonium sulfate (20% saturation). The more hydrophobic was a molecule in a sample, the more it was precipitated at a low salt saturation. Thus, proteins having larger or more hydrophobic patches aggregated and precipitated before those having smaller or fewer hydrophobic patches. Second, by hydrophobic chromatography experiments with a mild stationary phase (methyl stationary phase), carnocin CP5 was eluted with 0.3 M ammonium sulfate. It must be noted that this character was more apparent under denaturing conditions. The dissociating agent urea could favour the monomer form and thereafter allow the apparition of hydrophobic sites. Carnocin CP5 differed from carnocin UI49 (Stoffels et al. 1992b) that was eluted on a stronger stationary phase (phenyl stationary phase) with 0.5 M ammonium sulfate. As hydrophobic interactions were highly dependent on ionic strength and on the nature of the stationary phase, this indicated clearly that hydrophobic character of carnocin CP5 was more important than this of carnocin UI49.

Curing studies with novobiocin resulted in variants that were unable to produce carnocin CP5 and that had become sensitive to the parental bacteriocin. Plasmid profile analysis revealed that both variants had lost the plasmid pML6. Besides, the variant VCP52 had lost the pML2 and pML4 plasmids. These observations suggested that carnocin CP5 production character and resistance to the parental bacteriocin could be associated with the pML6 plasmid (>16 kpb). However, the confirmed association of bacteriocin production with pML6 plasmid-mediated genetic information will require further studies involving gene transfer. Linkage between bacteriocin production and resistance on the same plasmid was often encountered in bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria such as Lactobacillus sake (Schillinger and Lücke 1989; Mortvedt and Nes 1990) and Leuconostoc gelidum (Hastings et al. 1991). Among Carnobacterium spp., Ahn and Stiles (1990) reported that bacteriocin production and resistance to the bacteriocin produced were associated with two plasmids of 40 and 49 MDa. They supposed that C. piscicola LV 17 produced two bacteriocins. The same authors (Ahn and Stiles, 1992) demonstrated that bacteriocins encoded by pCP40 and pCP49 were different and independently produced in the same strain of C. piscicola LV 17.

A bactericidal effect on Listeria strain was observed in associated culture with C. piscicola CP5. On the contrary, no bactericidal effect was visible in associated culture with the non producing VCP52 variant. However, growth of Listeria in the presence of the VCP52 variant was slow down but nothing was similar to a lethal effect. A competition phenomenon could occur (Juillard et al. 1987). Only few informations were available about the mode of action of bacteriocins from Carnobacterium spp. against Listeria strains. Buchanan and Klawitter (1992) reported inhibitory action against L. monocytogenes Scott A in associative culture with C. piscicola LK5 at 5°C and in various cultural conditions. Schillinger and Holzapfel (1990) observed a weak inhibition against L. monocytogenes DSM 20600 by the agar well diffusion method. Ahn and Stiles (1990) reported a bactericidal mode of action of C. piscicola LV17 against C. divergens LV13. Carnocin UI49 (Stoffels et al. 1992a) had a bactericidal mode of action which resulted in lysis of sensitive cells, Lactococcus lactis NCDO 497.

Thus carnocin CP5, produced by C. piscicola CP5 in 1/2 MRS broth maintaining the pH at a constant value of 7.0, was different from already described bacteriocins produced by Carnobacterium spp.. The producer strain was for the first time isolated from a dairy product. The bacteriocin was under aggregate (MW around 30kDa) or monomer (MW around 3 to 4 kDa) forms, presented no apparent charge and had a hydrophobic nature. C. piscicola CP5 exerted a bactericidal mode of action on L. monocytogenes ATCC 15313, due to the production of carnocin CP5. Further experiments are currently in progress to purify to homogeneity carnocin CP5 to do comparisons with other anti-Listeria bacteriocins amino-acids sequences.

References

- Ahn C, Stiles ME (1990) Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of Carnobacterium piscicola from meat. Appl Environ Microbiol 56 : 2503-2510
- Ahn C, Stiles ME (1992) Mobilization and expression of bacteriocin plasmids from Carnobacterium piscicola isolated from meat. J Appl Bacteriol 73 : 217-228
- Benoit V, Mathis R, Lefebvre G (1993) Characterization of brevicin 27, a bacteriocin synthesized by Lactobacillus brevis SB27. Curr Microbiol (in press)

Buchanan RL, Klawitter LA (1992) Characterization of a lactic acid bacterium, Carnobacterium piscicola LK5, with activity against Listeria monocytogenes at refrigeration temperatures. J Food Safety 12 : 199-217

Bhunia AK, Johnson MC, Ray B (1987) Direct detection of an antimicrobial peptide of Pediococcus acidilactici in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Ind Microbiol 2 : 319-322

Hastings JW, Sailer M, Johnson K, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from Leuconostoc gelidum. J Bacteriol 173 : 7491-7500

Hécharde Y, Renault D, Cenatiempo Y, Letellier F, Maftah A, Jayat C, Bressolier P, Ratinaud MH, Julien R, Fleury Y, Delfour A (1993) Les bactériocines contre Listeria : une nouvelle famille de protéines? Le Lait 73 : 207-213

Juillard V, Spinnler HE, Desmazeaud MJ, Boquien CY (1987) Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Lait 67 : 149-172

Klaenhammer TR (1984) A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Curr Microbiol 10 : 23-28

Klaenhammer TR (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70 : 337-349

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685

Larsen AG, Vogensen FK, Josephsen J (1993) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs : purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by Lactobacillus bavaricus MI401. J Appl Bacteriol 75 : 113-122

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-273

Mathieu F, Sudirman Suwandhi I, Rekhif N, Millière JB, Lefebvre G (1993a) Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides FR52. J Appl Bacteriol 74 : 372-379

Mathieu F, Michel M, Lefebvre G (1993b) Properties of a bacteriocin produced by Carnobacterium piscicola CP5. *Biotech Lett* 15 : 587-590

Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A. and Lefebvre, G. (1994) Effect of carnocin CP5 and of the producer strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in physiological water, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* (accepted for publication manuscript N° 998/93).

Millière JB, Michel M, Mathieu F, Lefebvre G (1994) Presence of Carnobacterium spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *J Appl Bacteriol* (in press)

Mortvedt CI, Nes IF (1990) Plasmid-associated bacteriocin production by a Lactobacillus sake L45. *J Gen Microbiol* 136 : 1601-1607

Mortvedt CI, Nissen-Meyer J, Sletten K, Nes IF (1991) Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by Lactobacillus sake L45. *Appl Environ Microbiol* 57 : 1829-1834

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

Nettles CG, Barefoot SF (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J Food Prot* 56 : 338-356

Piard JC, Desmazeaud MJ (1992) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le Lait* 72 : 113-142

Piard JC, Muriana PM, Desmazeaud MJ, Klaenhammer TR (1992) Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis CNRZ 481. *Appl Environ Microbiol* 58 : 279-284

Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1993) Purification, cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *FEMS Microbiol. Rev. Poster* G34, pp 133.

Schillinger U, Holzapfel WH (1990) Antibacterial activity of carnobacteria. Food Microbiol 7 : 305-310

Schillinger U, Lücke F (1989) Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Appl Environ Microbiol 55 : 1901-1906

Shaw BG, Harding CD (1984) A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. J Appl bacteriol 56 : 25-40

Stoffels G, Nes IF, Gudmundsdottir A (1992a) Isolation and properties of a bacteriocin-producing Carnobacterium piscicola isolated from fish. J Appl Bacteriol 73 : 309-316

Stoffels G, Nissen-Meyer J, Gudmundsdottir A, Sletten K, Holo H, Nes IF (1992b) Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from Carnobacterium sp. Appl Environ Microbiol 58 : 1417-1422

Sudirman I, Mathieu F, Michel M, Lefebvre G (1993) Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by Lactobacillus curvatus SB13. Curr Microbiol 27 : 35-40

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol Rev 40 : 722-756

Van Laack RLJM, Schillinger U, Holzapfel WH (1992) Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by Leuconostoc carnosum LA44A. Int J Food Microbiol 16 : 183-195

Worobo, R.W., Roy, K.L., Sailer, M., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1993) Genetic determinants of carnobacteriocin A and the development of a food grade vector for multiple bacteriocin expression. FEMS Microbiol. Rev. 12, Poster G33, pp 133.

Table I : Ammonium sulfate precipitation

	Volume (ml)	Activity a) (AU/ml)	Total Activity (AU)	Protein b) Concentration (mg/ml)	Specific Activity (AU/mg protein)	Increase in Specific Activity	Yield (%)
Supernatant fluid	1000	6400	6400000	7.1	901	1.0	100
Concentrated Supernatant	350	25600	8960000	17.83	1435	1.6	140
Ammonium Sulfate Precipitation							
- 0-20%	27	12800	345600	4.45	2876	3.2	5.4
- 20-40%	17	6400	108800	3.96	1616	1.8	1.7
- 40-60%	23	12800	294400	13.5	948	1.1	4.6
- 60-80%	30	200	6000	12.25	16	0.018	0.09
- remaining solution	35	0	0	nd	nd	nd	nd

a) Titre of bacteriocin activity (AU/ml) was determined by the agar well diffusion method against Listeria monocytogenes ATCC 15313

b) Protein concentration was determined by the Lowry method (1951)
nd : not determined

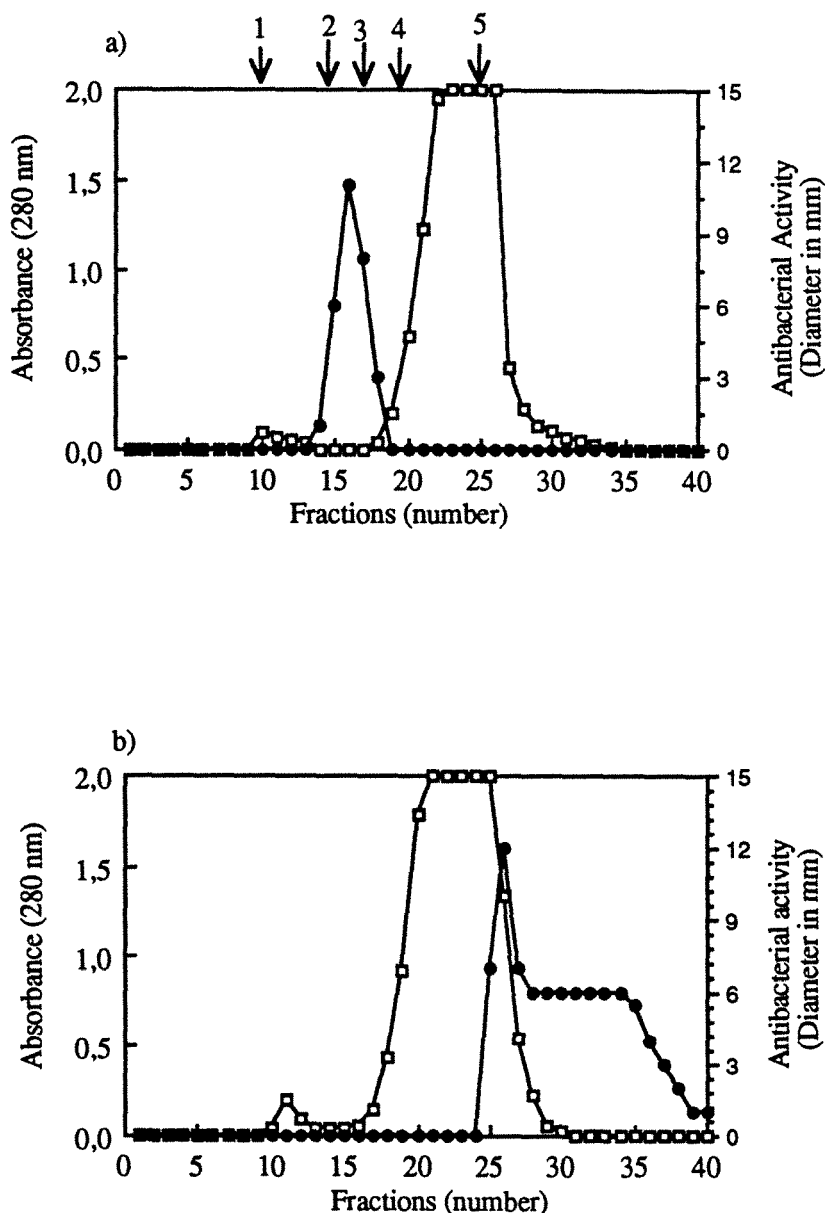


Fig. 1. Gel filtration chromatography on a Sephacryl S-200 (Pharmacia) support. Proteins elution (\square) was followed at 280 nm. Antibacterial activity (\bullet) was determined by the agar well diffusion method against *L. monocytogenes* ATCC 15313 and was estimated by the total inhibition diameter (in mm). Diameter of wells (5 mm) was already subtracted from the total inhibition one. a) Cell free supernatant fluid ; b) Cell free supernatant fluid treated with 8 M urea.

Molecular weight standard proteins were eluted in the following range 1 : dextran blue, 2 MDa ; 2 : BSA, 66 kDa ; 3 : anhydrase carbonic, 29 kDa ; 4 : cytochrome c, 12.4 kDa ; 5 : aprotinin, 6,5 kDa.

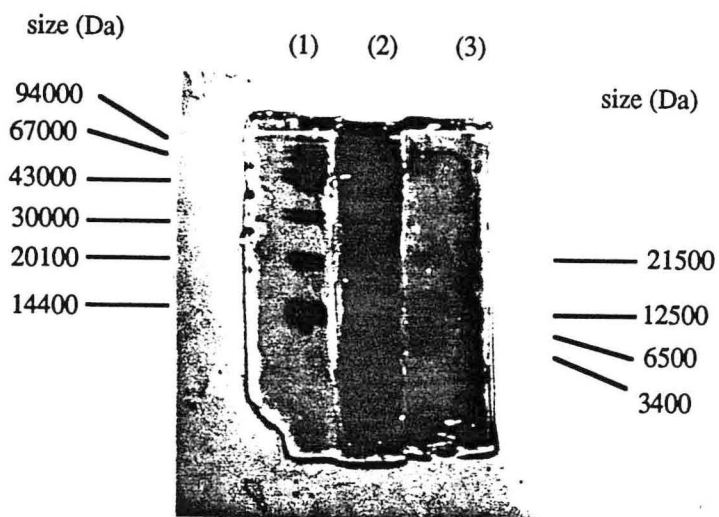


Fig. 2. Silver-stained SDS-PAGE gel of carnocin CP5. Lane 1, molecular weight standards phosphorylase B, 94000 ; BSA, 67000 ; ovalbumin, 43000 ; anhydrase carbonic, 30000 ; trypsin inhibitor, 20100 ; α -lactalbumin, 14400 (Pharmacia) ; Lane 2, carnocin CP5 precipitated at 40% ammonium sulfate saturation ; Lane 3, molecular weight peptide standards trypsin inhibitor from soybean, 21500 ; cytochrom C, 12500 ; aprotinin, 6500 ; insulin chain, 3400 (Combithek, Boehringer Mannheim GmbH Biochemica)

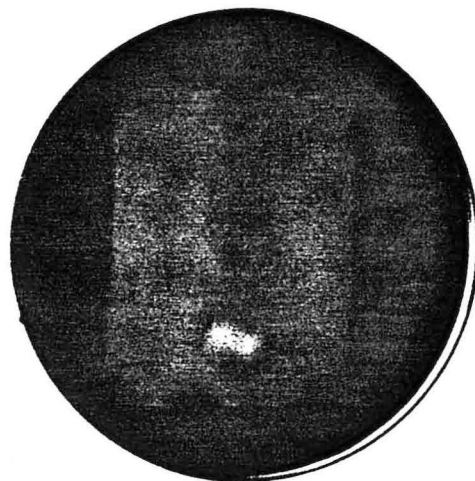


Fig. 3. Direct detection of carnocin CP5 activity after SDS-PAGE. Polyacrylamide gel was recovered with *L. monocytogenes* ATCC 15313 seeded soft IP Pasteur Production agar (8% bacteriological agar), supplemented with 2 ml.l⁻¹ Tween 80. Inhibition was detected after 10 h incubation at 37°C.

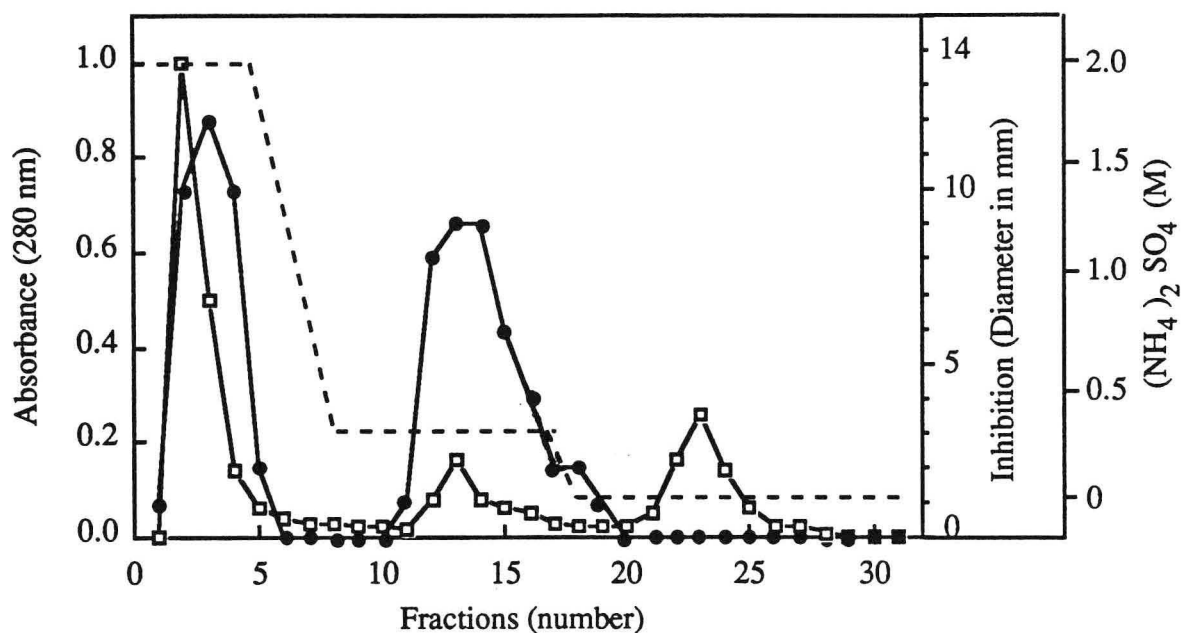


Fig. 4. Hydrophobic chromatography on Econopac HIC (Biorad) cartridge column. Proteins were followed at 280 nm (□). Antibacterial activity (●) was determined by the agar well diffusion method against *L. monocytogenes* ATCC 15313 and estimated by the total inhibition diameter (in mm). Diameter of wells (5 mm) was already subtracted from the total inhibition one. (---) Gradient (NH₄)₂SO₄ (M).

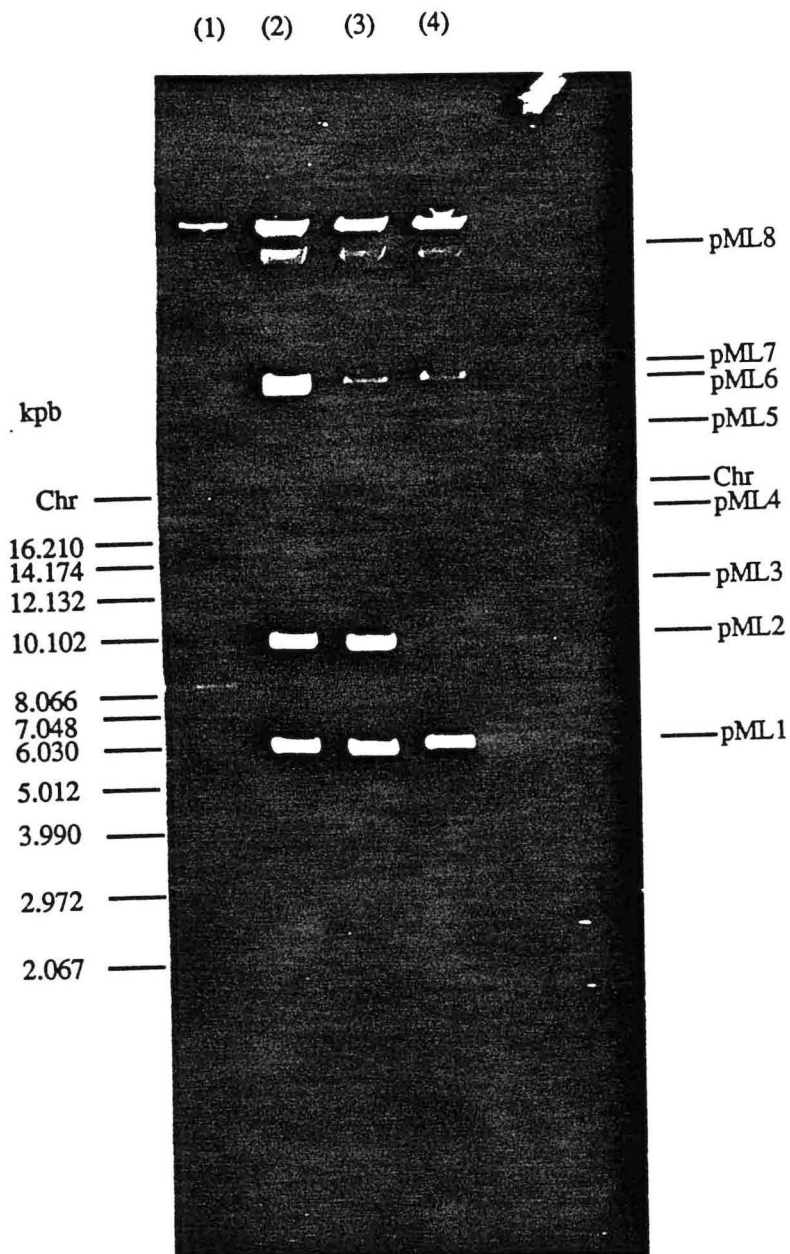


Fig. 5. Plasmid DNA profiles of *Carnobacterium piscicola* CP5 and variants. Lane 1 : molecular mass reference standard for plasmid size (Bethesda Research Laboratories) ; Lane 2 : *C. piscicola* CP5 parent strain ; Lane 3 : non producing variant VCP51 ; Lane 4 : non producing variant VCP52. Chr indicates the chromosomal band.

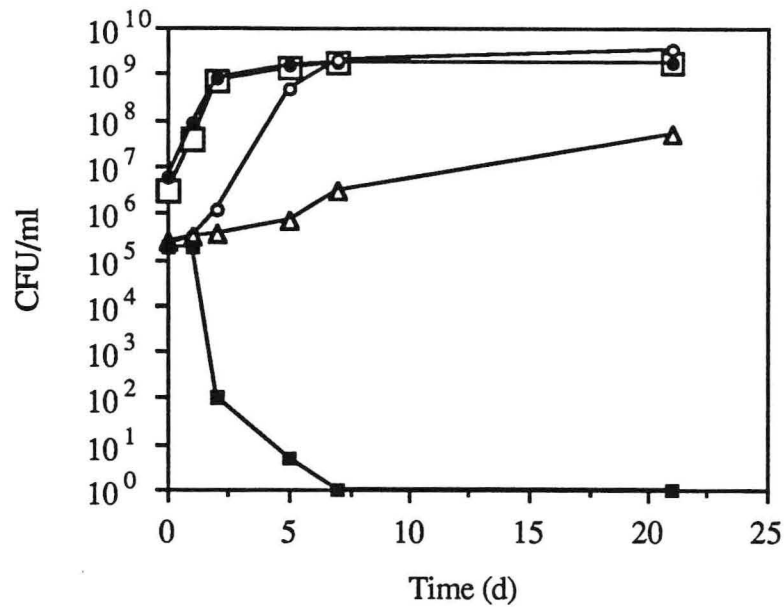


Fig. 6. Associated culture in TSYE broth, at 7°C. Growth of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in culture pure (○) ; in associated culture with *C. piscicola* CP5 (■) and with the VCP52 variant (△). Growth of *C. piscicola* CP5 in pure culture (□). Growth of the VCP52 variant in pure culture (●)

PUBLICATION N°4

Purification and partial amino-acid sequence of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5

MATHIEU, F., MATHIS, R., LEBRIHI, A. and LEFEBVRE, G.

Publication en préparation

PRESENTATION DES TRAVAUX

Les résultats chromatographiques préliminaires, décrits dans la publication précédente, nous ont permis par la suite d'établir un protocole de purification de la carnocine CP5, dont la séquence est la suivante : précipitation à 5% de saturation en sulfate d'ammonium, chromatographie échangeuse d'anions sur Econopac Q (Biorad), chromatographie d'interactions hydrophobes sur Econopac méthyle HIC (Biorad) puis chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne de type C₈ (Beckman).

Le titre de l'activité anti-*Listeria* est donné par la méthode des puits selon le protocole décrit dans la publication N°3. La quantité de protéines en mg.ml⁻¹, estimée par la méthode de Scopes (1988), en prenant la valeur de l'absorbance à 220 nm divisée par 11 (A₂₂₀/11), permet de déterminer l'activité spécifique, calculée en unités arbitraires par mg de protéines.

PRINCIPAUX RESULTATS

La production de la carnocine CP5 se fait à 30°C dans cinq litres de milieu de culture dont la composition a été précédemment déterminée, en fermenteur (Model SET 7B, SGI, Toulouse, France) afin de réguler le pH à une valeur de 7.0 par addition de NaOH, 6N. La pré-culture (2% v/v) est régulée manuellement à pH 7.0 avec NaOH (2.5 N) pendant 9 heures. Après 13 heures de fermentation, le surnageant de culture ou extrait brut, récupéré après centrifugation (15 min, 10000.g, 4°C), est concentré par évaporation.

La première étape de purification est la précipitation au sulfate d'ammonium. Cette étape est difficile à maîtriser en raison de la présence d'activité antibactérienne à la fois dans le culot de sédimentation et dans une pellicule flottante. De plus, l'adhésion partielle de ces culots à la paroi du tube de centrifugation rend aléatoire leur récupération. Les travaux présentés dans la publication N°3 montrent que la carnocine CP5 précipite dans les fractions 0-20% et 20-40% de saturation en sulfate d'ammonium. Une étude plus fine dans l'intervalle 0-40%, nous a permis de montrer l'existence de deux maxima d'activité, l'un à 5% de saturation en sulfate d'ammonium, l'autre dans la partie 10-40% (Tableau 1). La première fraction qui présente une activité spécifique supérieure à celle de la seconde, constitue le point de départ de nos études chromatographiques, malgré une perte de 85% de l'activité initiale (Tableau 1).

La deuxième étape de purification est une chromatographie échangeuse d'anions. L'échantillon issu de la précipitation à 5% de saturation en sulfate d'ammonium est déposé sur la résine préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl, 50 mmol.l⁻¹, pH 8.4. L'activité anti-*Listeria* est détectée lors du lavage de la résine avec le tampon d'équilibration, en présence de contaminants. Un second pic protéique est élué sous l'effet d'un gradient de NaCl de 0 à 2 mol.l⁻¹, contenant 32% des protéines initialement déposées mais totalement dépourvues d'activité anti-*Listeria*.

L'étape suivante est une chromatographie d'interactions hydrophobes. Les fractions issues de l'étape précédente sont rassemblées, concentrées, traitées avec de l'urée 8 mol.l⁻¹, puis déposées sur la résine Econopac méthyle HIC, préalablement équilibrée en sulfate d'ammonium 2 mol.l⁻¹. Lors du lavage de la résine avec le sulfate d'ammonium à 2 mol.l⁻¹ une partie de l'activité anti-*Listeria* est éluée en présence de protéines contaminantes. Un second pic d'activité est observé sous l'effet de la chute de la force ionique de 2 mol.l⁻¹ à 0 mol.l⁻¹ sous l'effet d'un palier à 0.3 mol.l⁻¹ en sulfate d'ammonium. A ce stade, 99% des protéines de l'extrait brut sont éliminées. Une augmentation de presque 16 fois dans l'activité spécifique est obtenue (Tableau 1).

La dernière étape est une chromatographie en phase inverse en HPLC réalisée sur une colonne de type C₈, équilibrée avec de l'eau ultra pure (Millipore) additionnée de 0.1% de TFA (Acide Trifluoroacétique) (tampon A). L'échantillon issu de la chromatographie d'interactions hydrophobes, additionné de 0.1% de TFA, est injecté sur la colonne. Après 15 minutes de lavage dans le tampon A, un gradient croissant de 0 à 100% d'acétonitrile additionné de 0.1% de TFA est appliqué. L'activité anti-*Listeria* est détectée dans deux pics d'absorbance à 220 nm. Le pic CP51 est élué sous l'effet d'un palier à 27% d'acétonitrile, alors que le pic CP52 l'est à 31% (Fig. 1).

Pour le moment seul le pic CP51 a été exploité. Un enrichissement de 1200 fois est obtenu. Le séquençage par la méthode de dégradation récurrente d'Edman détermine, pour ce pic d'activité, la séquence partielle de la partie N-terminale : ₂HN-X-Ileu-(Pro?)-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr- ; le résidu N-terminal n'ayant pu être identifié. Au niveau du neuvième résidu, aucun dérivé phénylthiohydantoïne (PTH) n'est obtenu, malgré plusieurs cycles de dégradation ; ensuite les cycles suivants ne permettent plus d'obtenir des dérivés PTH des acides aminés.

Purification and partial amino-acid sequence of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5

MATHIEU, F., MATHIS, R., LEBRIHI, A. and LEFEBVRE, G.

^aLaboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire.

ENSAIA-INPL, 2 Avenue de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre les Nancy France

Tel : 83.59.58.81. Fax : 83.59.58.04

Correspondence address : G. Lefebvre, Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire, ENSAIA-INPL, 2 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre les Nancy, FRANCE.

Abstract

Carnobacterium piscicola CP5, isolated from a French mould-ripened soft-cheese (Millière *et al.*, 1994), produced a bacteriocin named carnocin CP5 (Mathieu *et al.*, 1993b), active against *Listeria* spp. (Mathieu *et al.*, 1994a). Protocol purification of carnocin CP5, based on its preliminary characteristics (Mathieu *et al.*, 1994b), included several steps : ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and reverse phase chromatography on a C₈ column. Carnocin CP5 was eluted under two activity peaks CP51 and CP52, detected at 220 nm. Just for the CP51 peak, a partial N-terminal amino acid sequence was obtained by the recurrent Edman degradation. This partial sequence showed the presence of the consensus sequence -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-, already encountered in bacteriocins of lactic acid bacteria active against *Listeria* spp.

Introduction

Lactic acid bacteria produced various antimicrobial compounds, organic acids, hydrogen peroxyde, diacetyl and bacteriocins, that are defined, according to Tagg *et al.* (1976), as small antibacterial proteins active against closely related bacteria species. *Carnobacterium* spp. is a newly named genus (Collins *et al.*, 1987) including non aciduric atypical lactobacilli producing L(+) lactic acid from glucose through the glycolysis pathway. Bacteriocin production associated with this genus have been already reported (Nettles and Barefoot, 1993). All the carnobacteria producing strains were isolated either from meat and vacuum-packaged meat (Ahn and Stiles, 1990a ; Buchanan and Klawitter, 1992 ; Schillinger and Holzapfel, 1990) or from fish (Stoffels *et al.*, 1992a ; Pilet *et al.*, 1993). For the first time, Millière *et al.* (1994) demonstrated the presence of *Carnobacterium* spp. in dairy products. One of these isolates was found to produce a bacteriocin, named carnocin CP5, active against *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Listeria* spp. and only against the *delbrueckii* species from *Lactobacillus* genus (Mathieu *et al.*, 1993b). Partially-purified carnocin CP5, non specifically adsorbed on sensible or resistant strains, exerted a bactericidal effect accompanied by a cell lysis on *Listeria* spp. (Mathieu *et al.*, 1994a). Primary biochemical characteristics showed aggregate formation (around 30 kDa) dissociated in smaller active units (approximately 3-5 kDa) under denaturing conditions with urea or SDS, molecule without apparent ionic charge, hydrophobic character exerted in ammonium sulfate precipitation and in chromatography experiments on hydrophobic interaction column (Mathieu *et al.*, 1994b).

Three bacteriocins, carnocin UI49, carnobacteriocin A and carnobacteriocin B, produced by strains of *C. piscicola*, isolated from fish and from meat, have been described (Stoffels *et al.*, 1992b, Worobo *et al.*, 1993 and Quadri *et al.*, 1993) and purified to homogeneity. Their partial or total amino acid sequence were also recently determined.

In this study, purification and partial amino acid sequence of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *C. piscicola* CP5, isolated from a french mould-ripened soft-cheese, was reported.

Material and methods

Bacterial strains and media

Carnobacterium piscicola CP5, isolated from french surface mould-ripened soft-cheese (Millière *et al.*, 1993) was propagated at 30°C in MRS broth (Biokar, s.a., France) adjusted at an initial pH of 7.0. *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, used as indicator strain, was propagated at 37°C in tryptic soy broth (Biokar) supplemented with yeast extract (6 g.l⁻¹, Biokar), TSYE broth. These two bacterial strains were maintained frozen at -20°C and were propagated twice, in broth media, before experimental use.

Carnocin CP5 production

C. piscicola CP5 was grown at 30°C, on a 5 litres 1/2 MRS broth supplemented with 0.5 ml.l⁻¹ Tween 80 (Merck) and 2.5 g.l⁻¹ yeast extract, in a 7 litre fermentor (Model SET 7B, SGI, Toulouse, France) regulated at pH 7.0 with 6M sodium hydroxyde. Agitation was set at 100 rpm. Cell free supernatant fluid or crude extract was recovered after 13 h of growth by removing the producer strain by centrifugation (5000 g, 15 min, 4°C).

Carnocin CP5 detection

Carnocin CP5 activity was detected by the agar well diffusion method against *L. monocytogenes* ATCC 15313 as described previously (Mathieu *et al.*, 1993b) but with the following modifications : soft agar (8% bacteriological agar, Biokar) medium IP Pasteur Production (Mathieu *et al.*, 1993a) was supplemented with 2 ml.l⁻¹ Tween 80 and poured in Petri dishes. Diffusion was held overnight at 4°C. Inhibition zones were examined after 10 h incubation at 37°C.

Activity assay

Carnocin CP5 activity was estimated by the critical dilution method. Serial two-fold dilutions of bacteriocin extracts were tested by the agar well diffusion method described above. The titre, expressed in activity units per millilitre (AU.ml⁻¹), was defined as the reciprocal of the highest dilution showing a definite inhibition zone.

Purification protocol of carnocin CP5

All purification steps were performed at ambient temperature. The low pressure chromatographic equipment was obtained from Biorad (Richmond, USA) and the high one from Waters (Millipore). A carnocin CP5 crude extract, obtained after culturing on 1/2 MRS broth (5000 ml, pH 7.0), was eight-fold concentrated by rotary evaporator and submitted to a fractionated ammonium sulfate precipitation at pH 7.0. Precipitates were pelleted by centrifugation (15000 g, 30 min, 4°C) and resuspended in 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.4 (buffer A). Fraction I, corresponding to the anti-*Listeria* activity precipitated since 5% saturation ammonium sulfate, was loaded onto a 30 ml Econo Q anion exchange chromatography column pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 60 ml buffer A, after which an increasing linear NaCl gradient (0 to 2 mol.l⁻¹) was applied. Fractions of 3 ml were collected and tested for antibacterial activity against *L. monocytogenes* ATCC 15313 by the agar well diffusion method. Those displaying anti-*Listeria* activity were pooled (fraction II). To this fraction II, pre-treated with urea (8 mol.l⁻¹) a dissociating agent, ammonium sulfate was added to obtain a final concentration of 0.1 mol.l⁻¹. The solution was applied to a 5 ml methyl hydrophobic HIC (Econopac HIC, Biorad, Richmond, USA) chromatography column equilibrated with 50 mmol.l⁻¹ sodium phosphate buffer / 2 mol.l⁻¹ ammonium sulfate, pH 6.0 (buffer B). The column was washed with 25 ml of buffer B and the bacteriocin was then eluted by a decreasing gradient from 2 to 0 mol.l⁻¹ ammonium sulfate (fraction III). The fraction III, containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) was further purified by reverse-phase HPLC on a 3.6 cm 300Å C₈ column (Beckman) pre-equilibrated with H₂O (Milli Q, Millipore) containing 0.1% (v/v) TFA at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Elution of proteins was performed by running a 72 min increasing from 0 to 31% (v/v) acetonitrile gradient containing 0.1% TFA (1 ml.min⁻¹). Fractions were tested for anti-*Listeria* activity, collected and then evaporated in a Speed-vac concentrator (fraction IV). Purity of fraction IV was checked according to UV spectrum analysis (200-340 nm) using the Focus program (Spectra-Physics). A part of the sample was kept for direct sequencing.

Amino acid sequence determination

The amino-terminal sequence analysis of the carnocin CP5 was performed by L. Denoroy (at the Service Central d'Analyse, Centre National de la Recherche Scientifique, Vernaison, France) by the recurrent Edman degradation.

Results

Purification of carnocin CP5

Carnocin CP5 production was improved in 1/2 MRS broth, supplemented with yeast extract (2.5 g.l⁻¹) and Tween 80 (0.5 ml.l⁻¹), regulated at pH 7.0, at 30°C, during 13h, in a 7 litres fermentor. The crude extract, eight-fold concentrated by evaporation without losing anti-*Listeria* activity (Table 1), was submitted to ammonium sulfate precipitation. At this step, carnocin CP5 activity was recovered in several ammonium sulfate fractions : 0-5%, 5-10% and 10-40% saturation with respectively 2813, 574 and 1085 as specific activity (AU.mg⁻¹ proteins). The 0-5% ammonium sulfate saturation, fraction I, having the best specific activity was kept for further purification as summarized in table 1. However about 90% of the activity was lost. Fraction I was loaded on anion exchange chromatography column. Carnocin CP5 activity was not bound to the stationary phase and so it was recovered during the washing of the column (fraction II). Fraction II treated with urea (8 mol.l⁻¹) was applied to a methyl hydrophobic interaction column. Under high salt conditions, carnocin CP5 activity was dissociated into two fractions : one fraction was recovered during the washing of the column with buffer B and the other one was bound to the stationary phase and then eluted with 0.3 mol.l⁻¹ ammonium sulfate (Fraction III), with an approximately sixteen-fold increase in specific activity (table 1, Fraction III). The final step which was required to obtain pure bacteriocin from fraction III was reverse-phase HPLC on a C₈ column. Carnocin CP5 activity was eluted under two peaks of activity detected at 220 nm. The CP51 peak was eluted at 27% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) TFA, while the CP52 peak at 31% (Fig. 1). At this stage, only the CP51 peak was studied. Specific activity of this CP51 peak increased by 1200 fold with a yield of 0.15%. According to UV spectrum analysis (200-340 nm) of this peak, using the Focus program (Spectra-Physics), the bacteriocin was considered to be pure. Part of the pure carnocin CP51 sample was kept for amino acid sequencing.

Partially primary sequence

N-terminal amino acid sequence was carried out by automated Edman degradation. The sequence of the first nine amino acids in the peptide chain was γ HN-X-Ileu-(Pro?)-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr-. The N-terminal analysis was performed twice, but the N-terminal amino acid could not be identified. After eight amino acids, the yield of phenylthiohydantoin derivatized residues decreased sharply and no phenylthiohydantoin derivatives were detected after eight residue.

Discussion

Carnocin CP5 is the first bacteriocin identified and characterized from a strain of *Carnobacterium piscicola* isolated from dairy product (Millière *et al.*, 1994). Previous results have shown that carnocin CP5 already precipitated at 20% ammonium sulfate saturation in contrast to other lactic acid bacteriocins. In this study, carnocin CP5 precipitated since 5% ammonium sulfate saturation with a best specific activity than in 5-10% and 10-40% ammonium sulfate saturation. However, 90% bacteriocin activity was lost at this step. Among lactic acid bacteriocins, a such low percentage ammonium sulfate saturation was never encountered. As expected in view of previous results, carnocin CP5 did not adsorb on anionic stationary phase. In the case of lacticin 481 (Piard *et al.*, 1992), in cation or anion exchange chromatography, activity was eluted along the entire chromatographic profile. In the carnocin CP5 purification protocol, the maximum apparent increase in total activity (yield) was obtained after hydrophobic interaction column and reverse phase chromatography, both based on hydrophobic interactions. Just before these two steps, fraction II was treated with urea, inducing the obtention of smaller active units, which might be more active than the aggregate form and which could induce the apparition of hydrophobic sites. Similar phenomenon were also reported for curvacin A and sakacin P purification (Tichaczek *et al.*, 1992) and also observed with helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1985) or with lactocin S (Mortvedt *et al.*, 1991). A dramatically low yield was finally obtained, less than 1% like for the carnobacteriocin B purification with 0.06%, 0.44% and 0.19% for respectively the B1, BM1 et B2 forms (Quadri *et al.*, 1993).

The sequence analysis of carnocin CP5 by Edman degradation stopped after 9 amino acids supposing that only part of the sequence of carnocin CP5 was determined. This may be caused by the presence of several cysteine residues or modified or unusual amino acids such as lanthionine, which has been already detected in several bacteriocins named lantibiotics (Klaenhammer, 1993). Such structure would indeed result in block or blank cycles in the Edman degradation. Among bacteriocins from *Carnobacterium* spp. the carnocin UI49 sequencing stopped after seven residus (Stoffels *et al.*, 1992b) ; presence of lanthionine and methylanthionine were confirmed by amino acid composition analysis. Comparison of partial amino acid sequence of carnocin CP5 with the carnocin UI49 one and with the other lantibiotics one such as nisin (Kaletta and Entian, 1989) lacticin 481 (Piard *et al.*, 1992) lactococcin (Dufour *et al.*, 1991), and lactocin S (Mortvedt *et al.*, 1991), did not present similarity. However, carnocin CP5 shared some homology in the N-terminal region with the newly sequenced bacteriocins, leucocin A-UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991), mesentericin Y105 (Hécharde *et al.*, 1992), pediocin PA-1 (Henderson *et al.*,

1992 ; Lozano *et al.*, 1992), pediocin AcH (Motlagh *et al.*, 1992), sakacin A (Holck *et al.*, 1992) sakacin P and curvacin A (Tichaczek *et al.*, 1992), bavaricin A (Larsen *et al.*, 1993), carnobacteriocins BM1 and B2 (Quadri *et al.*, 1993) (Fig. 2). All these bacteriocins antagonized *Listeria* spp. and were characterized by a consensus sequence in the N-terminal region of -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-. Xaa represented an amino acid which can vary among those bacteriocins. In contrast, amino acid cysteine was always encountered at this position. In the case of carnocin CP5, Edman degradation stopped here, allowing to give the hypothesis of the presence of a sulfure or disulfure bridge. The role of this consensus sequence is not well known. It could represent a conserved region related to a similar fonction in the cellular mechanism of action. Excepted the consensus sequence, carnocin CP5 differed from carnobacteriocins B2 and BM1 in so far as amino acid sequence of those bacteriocins did not block after cysteine residue. Moreover, in contrast of carnocin CP5, carnobacteriocins B2 and BM1 antagonized a *Lactobacillus plantarum* strain (Quadri *et al.*, 1993). So carnocin CP5 may be considered like a new bacteriocin among *Carnobacterium* spp.. Further experiments are now conducted to determine amino acid composition, and molecular mass by mass spectrometry analysis to make more precise comparisons with the other carnobacteriocins.

References

- Ahn, C. and Stiles, M.E.(1990a) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. J. Appl. Bact. 69, 302-310.
- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990b) Plasmid associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2503-2510.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1992) Characterization of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Food Safety 12, 199-217.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S. and Jones, D. (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. Int. J. Sys. Bacteriol. 37, 310-316.

Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C.M. and Le Pennec, J.P. (1991) Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. J. Gen. Microbiol. 137, 2423-2429.

Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1991) Characterization of Leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol. 173, 7491-7500.

Héchar, Y., Dérijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Gen. Microbiol. 138, 2725-2731.

Henderson, J.T., Chopko, A.L. and van Wassenaar, P.D. (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Arch. Biochem. Biophys. 295, 5-12.

Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.E., Aukrust, T. and Blom, H. (1992) Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. J. Gen. Microbiol. 138, 2715-2720.

Kaletta, C. and Entian, K.D. (1989) Nisin, a peptide antibiotic : cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. J. Bacteriol. 171, 1597-1601.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12, 39-86.

Larsen, A.G., Vogensen, F.K. and Josephsen, J. (1993) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs : purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J. Appl. Bacteriol. 75, 113-122.

Lozano, J.C.N., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Pelaz, C. and Nes, I.F. (1992) Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. gen. Microbiol. 138, 1985-1990.

Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledebor, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M. Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C.M. and Vandenberg, P.A. (1992) Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2360-2367.

Mathieu, F., Sudirman Suwandhi, I., Rekhif, N. Millière, J.B. and Lefebvre, G. (1993a) Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 372-379.

Mathieu, F., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993b) Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotech. Lett.* 15, 587-590.

Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A. and Lefebvre, G. (1994a) Effect of carnocin CP5 and of the producer strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in physiological water, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* (accepted for publication manuscript N° 998/93).

Mathieu, F., Mathis, R., Lebrihi, A. and Lefebvre, G. (1994b) Characterization and plasmid-linkage of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. (unpublished data)

Millière, J.B., Michel, M., Mathieu, F. and Lefebvre, G. (1994) Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *J. Appl. Bacteriol.* (in press).

Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I.F. (1991) Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1892-1843.

Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szostek, F., Hansen, T.R., Johnson, M.C. and Ray, B. (1992) Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 45-48.

Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Protect.* 56, 338-356.

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

Pilet, M.F., Piard, J.C., Desmazeaud, M., Novel, G. and Dousset, X. (1993) Evidence for a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* isolated from fish products. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G21, *FEMS Microbiol. Rev.* 12 : 127.

Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1993) Purification, cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G34, *FEMS Microbiol. Rev.* 12 : 133.

Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (1990) Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiol.* 7, 305-310.

Stoffels, G., Nes, I.F. and Gudmundsdottir, A. (1992a) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 309-316.

Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I.F. (1992b) Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1417-1422.

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

Tichacek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F. and Vogel, R.F. (1992) Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *System. Appl. Microbiol.* 15, 460-468.

Worobo, R.W., Roy, K.L., Sailer, M., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1993) Genetic determinants of carnobacteriocin A and the development of a food grade vector for multiple bacteriocin expression. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G33, *FEMS Microbiol. Rev.* 12 : 133.

Table 1 : Purification protocol of carnocin CP5

Purification step	Volume (ml)	Activity ^{a)} (AU.ml ⁻¹)	Total activity (AU)	Protein ^{b)} concentration (mg.ml ⁻¹)	Specific activity (AU.mg ⁻¹)	Increase in specific activity	Yield (%)
Crude extract	5000	6400	3.2.10 ⁷	10.8	592	1	100
Concentrated extract	625	51200	3.2.10 ⁷	81.1	631	1.06	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionated precipitation							
5% saturation (Fraction I)	80	51200	4.1.10 ⁶	18.2	2813	4.75	12.8
5-10% saturation	60	12800	7.6.10 ⁵	22.3	574	0.96	2.4
10-40% saturation	60	25600	5.3.10 ⁶	23.6	1085	1.83	4.8
Econo Q column (fraction II)	100	25600	2.56.10 ⁶	10	2560	4.3	8
HIC column (fraction III)	20	12800	2.56.10 ⁶	1.37	9343	15.8	0.8
Cg column (fraction IV)	7.5	6400	4.8.10 ⁴	9.10 ⁻³	711 111	1201	0.15

a) Titre of bacteriocin activity (AU.ml⁻¹) was determined by the agar well diffusion method against *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

b) Protein concentration (mg.ml⁻¹) was estimated by A₂₂₀/11 (Scopes, 1987)

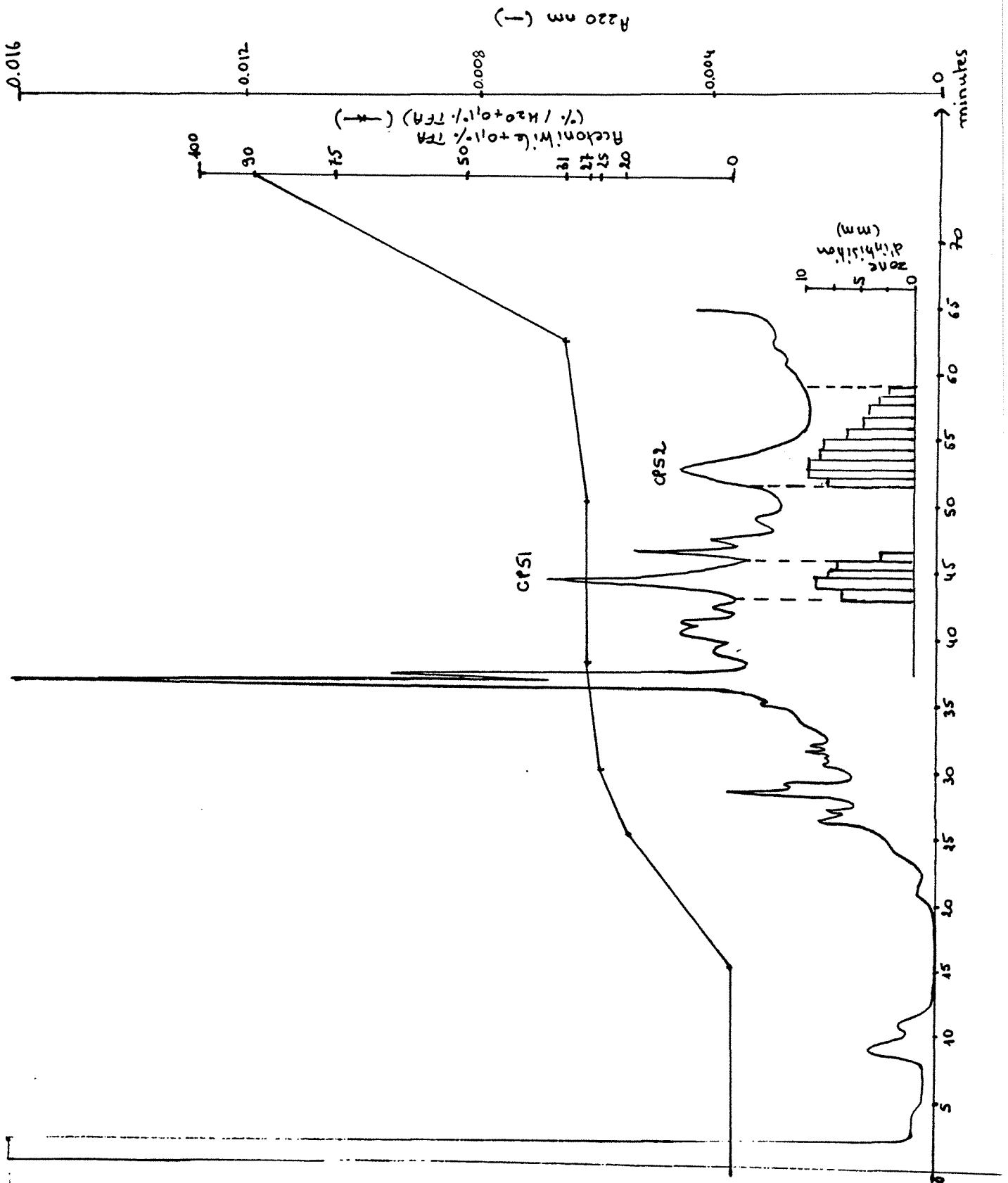


Figure 1 : Reverse phase chromatography of fraction III on a C₈ column. Detection of anti-*Listeria* activity by the agar well diffusion method Flow rate : 1ml. min⁻¹, 500 µl fractions were collected.

	1				5					10					15	
pediocin AcH	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Lys	His	Ser	Cys	Ser	
pediocin PA-1	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Lys	His	Ser	Cys	Ser	
sakacin A	Ala	Arg	Ser	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr	Cys	Asn	Asn	Lys	Lys	Cys	Trp
sakacin P	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	His	Cys	Gly	Lys	His	Ser	Cys	Thr	
curvacin A	Ala	Cys	Ser	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr	Cys	Asn	Asn	Lys	Lys	Ser	Trp
bavaricin A	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	His	Xaa	Gly	Lys	His	Ser	Xaa	Thr	
leucocin A-UAL187	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	His	Cys	Thr	Lys	Ser	Gly	Cys	Ser	
mesentericin Y105	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	His	Cys	Thr	Lys	Ser	Gly	Cys	Ser	
carnobacteriocin B2	Val	Asn	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Ser	Cys	Lys	Tyr	Lys	Cys	Ser	Val	
carnobacteriocin BM1	Ala	Ileu	Ser	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr	Cys	Asn	Lys	Glu	Lys	Cys	Trp
carnocin CP5	Xaa	Ileu	(Pro?)	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr							

Figure 2 : Comparison of the N-terminal amino acid sequences of several lactic acid bacteriocins

Xaa represented non identified amino acid residue

This scheme only showed partial sequence of the other bacteriocins, also differences existing after the fifteenth amino acid did not appear

PUBLICATION N°5

Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain Carnobacterium piscicola CP5 on the viability of Listeria monocytogenes ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures

MATHIEU F., MICHEL M., LEBRIHI A. and LEFEBVRE G.

Publication acceptée dans
International Journal of Food Microbiology

PRESENTATION DES TRAVAUX

Le mode d'action de l'isolat *C. piscicola* CP5 vis-à-vis de *L. monocytogenes* ATCC 15313 est étudié dans différentes conditions opératoires. Deux types d'expériences sont réalisées : soit l'utilisation de la molécule partiellement purifiée, soit celle de la souche productrice.

- La carnocine CP5, partiellement purifiée, est ajoutée à une concentration finale de 2000 UA.ml⁻¹, à une culture de *L. monocytogenes* ATCC 15313ensemencée à un taux initial de 1.10³ ufc.ml⁻¹ dans un milieu semi synthétique EB. Les températures d'incubation sont de 30°C, 15°C ou 7°C. L'évolution de la population de listeria est suivie par son dénombrement sur le milieu sélectif Oxford (Oxoid) après incubation de 48 heures à 37°C. La même procédure est suivie lorsque le milieu de croissance est le lait UHT ; ici deux températures (15°C ou 7°C) ont été testées.

La carnocine CP5 est ajoutée, également à 2000 UA.ml⁻¹ en concentration finale, à des cellules lavées de *L. monocytogenes* ATCC 15313, resuspendues dans de l'eau physiologique (méthode des "resting cells" ou cellules non proliférantes). Les températures d'incubation sont 30°C, 15°C ou 7°C. L'évolution de la population de *L. monocytogenes* ATCC 15313 est suivie par la mesure de l'absorbance à 660 nm. Cette méthode permet aussi d'estimer l'adsorption éventuelle de la carnocine CP5 sur *L. monocytogenes* ATCC 15313. La quantité de bactériocine récupérée dans le surnageant après élimination des cellules cibles est estimée par la méthode des puits. La diminution du titre en bactériocine entre la quantité initiale et celle trouvée après contact avec les cellules sensibles indique l'adsorption de la carnocine CP5. La souche *C. piscicola* CP5 est utilisée comme témoin en tant que souche résistante à la bactériocine.

- Par la méthode de co-culture, *C. piscicola* CP5 (1.10⁷ ufc.ml⁻¹) et *L. monocytogenes* ATCC 15313 (1.10⁶ ufc.ml⁻¹) sont associées dans le milieu semi synthétique EB à 30°C, 7°C ou 4°C, ou sur lait UHT à 15°C, 7°C ou 4°C. En parallèle, chacune des souches est cultivée en culture pure. L'évolution de la population de *Listeria* est suivie par dénombrement sur milieu Oxford après une incubation de 48 heures à 37°C. Celle des carnobactéries est suivie par dénombrement sur milieu EB après 48 heures d'incubation à 30°C. La production de la carnocine CP5 est préalablement vérifiée sur milieu EB dans cette large gamme de températures. Le variant VCP52 (non producteur de

bactériocine à la suite d'une cure d'ADN plasmidique par l'action de la novobiocine) en co-culture avec *L. monocytogenes* ATCC 15313, sert de témoin à l'expérience.

PRINCIPAUX RESULTATS

La carnocine CP5 mise en contact avec des cellules en croissance de *L. monocytogenes* ATCC 15313, en milieu semi synthétique EB, induit une diminution de la population viable quelle que soit la température d'incubation. La carnocine CP5 possède donc un effet bactéricide sur *L. monocytogenes* ATCC 15313. Cependant à 30°C, l'effet est réduit et transitoire (Fig. 3) ; à 15°C, l'effet est visible sur 2 jours avec 5 log décimaux perdus par rapport au témoin ; puis il y a reprise de la croissance pour atteindre le même niveau que dans la population témoin au bout de 7 jours (Fig. 4a). A 7°C, l'effet bactéricide est le plus marqué : c'est un effet lent et régulier ; au bout de 7 jours, aucune listéria n'est dénombrée dans le milieu et cela jusqu'à 14 jours d'incubation (Fig. 4b). Dans du lait UHT, à 15°C ou 7°C, l'effet bactéricide est visible respectivement pendant 2 et 7 jours (Fig. 5a et Fig. 5b). Même à 7 °C, il n'y a pas élimination complète de la population initiale de *L. monocytogenes* ATCC 15313, comme sur milieu EB.

Sur des cellules cibles au repos, dans de l'eau physiologique, la carnocine CP5 conserve son effet bactéricide quelle que soit la température. L'absorbance à 660 nm diminue de 50%, en 8 heures environ à 30°C ; en 30 heures à 15°C et en 2 jours à 7°C (Fig. 2). L'effet bactéricide est donc accompagné d'une lyse cellulaire qui se traduit par la diminution de l'absorbance à 660nm. Le titre en bactériocine est réduit de moitié après le contact aussi bien avec la souche sensible *L. monocytogenes* ATCC 15313 qu'avec la souche résistante *C. piscicola* CP5 servant de témoin (productrice de la bactériocine). La carnocine CP5 s'adsorbe de façon non spécifique sur les cellules sensibles et résistantes.

Avant d'envisager les expériences de co-culture, la croissance et la production de la carnocine CP5 ont été vérifiées sur milieu EB, non régulé, incubé entre 4°C et 30°C. Quelle que soit la température, la croissance de *C. piscicola* CP5 s'arrête à un pH d'environ 5.0, avec une valeur d'absorbance de 1.5 unités. La production de la carnocine CP5 est détectée dès le début de la phase exponentielle de croissance et atteint un maximum à la fin de cette phase (Fig. 1). Ainsi, en milieu EB, *C. piscicola* CP5 produit la carnocine CP5 entre 4°C et 30°C.

En co-culture en milieu semi synthétique EB, *C. piscicola* CP5 montre un effet bactéricide sur *L. monocytogenes* ATCC 15313, principalement à 7°C et 4°C (Fig.6b et Fig.6c) avec une réduction respectivement de 8 log décimaux en 7 jours et de 7 log en 14 jours, par rapport à la population de *Listeria* en culture pure. A 30°C, l'effet bactéricide apparent se limite aux 2 premiers jours de la prolifération de *Listeria* (Fig. 6a).

Sur lait UHT, quelle que soit la température 15°C, 7°C ou 4°C, après 21 jours d'incubation, la population de *L. monocytogenes* ATCC 15313 est réduite respectivement de 7 log, 3 log et 4 logs décimaux.

La croissance associée du variant non producteur VCP52 avec *L. monocytogenes* ATCC 15313, sur EB, à 7°C, n'entraîne pas d'effet bactéricide (Fig. 7a). Une réduction de la population de *Listeria* due au pH n'est guère possible, car le pH final d'une culture pure de *Listeria* est inférieur à celui d'une carnobactérie. Ainsi, l'effet bactéricide est principalement lié à la présence de la carnocine CP5 produite dans le milieu dès le début de la phase exponentielle de croissance.

**Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain
Carnobacterium piscicola CP5 on the viability of Listeria monocytogenes
ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various
incubation temperatures**

MATHIEU F., MICHEL M., LEBRIHI A. and LEFEBVRE G.

Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire, ENSAIA-INPL, 2 Avenue de la
Forêt de Haye ; 54500 Vandoeuvre les Nancy, FRANCE.

Tel : (33) 83.59.58.81 Fax : (33) 83.59.58.04

Correspondence address : G. Lefebvre, Laboratoire de Microbiologie Industrielle et
Alimentaire, ENSAIA-INPL, 2 Avenue de la Forêt de Haye; 54500 Vandoeuvre les Nancy,
FRANCE.

ABSTRACT

Carnobacterium piscicola CP5, isolated from French mould-ripened soft-cheese, produced a bacteriocin named carnocin CP5 in a wide range of incubation temperatures, from 4°C to 30°C. The ability of a crude bacteriocin, of a partially-purified form, and of the producer strain to inhibit growth of Listeria monocytogenes ATCC 15313 was examined in salt solution, broth and skimmed milk between 4°C and 30°C. When carnocin CP5 was added to a L. monocytogenes ATCC 15313 culture, an adsorption on cells and a bactericidal effect with a cell lysis occurred. At 30°C, with carnocin CP5 or with C. piscicola CP5, a transitory bactericidal effect was observed. Subsequent experiments realized at 4°C, 7°C or 15°C, showed a more prolonged bactericidal effect. Thus at 7°C, partially-purified carnocin CP5 reduced an initial population level of L. monocytogenes of 10³ cfu/ml to non detectable level within 7 days. However, in some cases, with extended incubation, the carnocin CP5 effect was no longer visible, the L. monocytogenes population grew again. This phenomenon was probably due to the presence of a sub-population of bacteriocin-resistant variants.

Key words : bacteriocin, Carnobacterium, Listeria, co-culture, inhibitory action

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen which is of major concern due to its ability to grow in a variety of foods at refrigeration temperatures (Carrosella, 1990 ; Farber et al., 1990 ; Farber, 1991). Recent studies were undertaken to consider bacteriocins as alternative preserving agents to reduce food additive concentration (Morgan, 1992). However little published reports were available about the effectiveness of bacteriocins or of the producer strains to control Listeria spp. in food systems (Buchanan and Klawitter, 1992b ; Motlagh et al., 1992 ; Pucci et al., 1988 ; Schillinger et al., 1991).

Carnobacterium spp. is a newly named genus (Collins et al., 1987) including non aciduric, atypical lactobacilli isolated from vacuum-packaged meat, poultry and fish (Holzapfel and Gerber, 1983 ; Hiu et al., 1984 ; Shaw and Harding, 1985). Several groups of investigators have already reported bacteriocin production associated with this genus with activity towards carnobacteria and other lactic acid bacteria (Ahn and Stiles, 1990 ; Stoffels et al., 1992) and in addition towards Listeria spp. (Buchanan and Klawitter, 1992a ; Schillinger and Holzapfel, 1990 ; Quadri et al., 1992). Recently Millière et al. (1994) discovered the presence of Carnobacterium spp. in French mould-ripened soft-cheeses and one of these isolates was found to produce a bacteriocin named carnocin CP5, active against carnobacteria, thermophilic lactobacilli (Lactobacillus delbrueckii), Enterococcus spp. and Listeria spp. (Mathieu et al., 1993b). Little information is available about the mode of action of bacteriocins from Carnobacterium spp. A bactericidal effect on indicator strains was reported (Ahn and Stiles, 1990 ; Schillinger and Holzapfel, 1990), with a cell lysis (Stoffels et al., 1992). Buchanan and Klawitter (1992a) reported an inhibitory action on Listeria monocytogenes Scott A, mainly at 5°C, in co-culture with the producer strain Carnobacterium piscicola LK5, in different cultural conditions.

In this current study, characterization of the inhibitory activity against Listeria spp. was investigated. Growth of the indicator strain L. monocytogenes ATCC 15313 was followed either after addition of partially-purified carnocin CP5 or in co-culture with the producer strain C. piscicola CP5. Experiments were carried out in salt solution, in TSYE broth, and in skimmed milk, at incubation temperatures of 4°C, 7°C, 15°C, and 30°C.

MATERIALS AND METHODS

Strains and media

Carnobacterium piscicola CP5 from our laboratory collection (Mathieu *et al.*, 1993b) was maintained as frozen stock at -20°C and before use was propagated twice at 30°C in Tryptase Soy broth (TS) (Biomérieux, Craponne, France) supplemented with 0,6% Yeast Extract (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). This medium was named TSYE.

Listeria strains were isolated in our laboratory from various foodstuffs and some of them were also obtained from Institut Pasteur Collection (IP, Paris, France) and from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Before use, they were propagated in TSYE broth at 30°C or 37°C (Table I).

Measurement of bacteriocin activity

Antilisterial activity (Table I) was determined by the agar well diffusion method as previously described (Mathieu *et al.*, 1993b) with following modifications : indicator Listeria strains were inoculated in a soft agar (0.8% bacteriological agar, Biokar) medium IP Pasteur Production (Mathieu *et al.*, 1993a) supplemented with 2ml/l Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) and poured in Petri dishes. Agar plates were allowed to diffuse overnight at 4°C and then incubated at 30°C or 37°C for at least 10 h. Titre of carnocin CP5, in Arbitrary Units per millilitre (AU/ml), determined by the critical dilution method, was expressed as the reciprocal of the highest dilution showing a definite zone of inhibition. Assays were performed in duplicate.

Bacterial counts

Viable L. monocytogenes ATCC 15313 cells were enumerated on Listeria Selective Medium Oxford (Oxoid, Unipath Limited, Basingstoke, Hampshire, England) after incubation for 48h at 37°C. C. piscicola CP5 was enumerated on TSYE agar (1.5% bacteriological agar) after incubation for 48h at 30°C. In co-cultures, periodically 5.0 ml samples were removed from each flask, diluted appropriately with sterile tryptone salt (Biokar) and plated in duplicate on pre-poured Listeria Selective Medium or TSYE agar plates. The TSYE plates, that were used to provide a total aerobic plate count of the bacteria in the co-cultures (CP5 + L. monocytogenes) were incubated for 48 h at 30°C. The Listeria Selective Medium plates, on which C. piscicola CP5 did not grow but on which L. monocytogenes produced characteristic black colonies, were incubated for 48h at 37°C. The level of C. piscicola CP5 was estimated by subtracting the population level of Listeria Selective Medium value from the population level of TSYE count.

Bacteriocin production in broth

An overnight culture of *C. piscicola* CP5 (10^9 cfu/ml) was used to inoculate TSYE broth (2% v/v) that was further incubated at 4°C, 7°C, 15°C and 30°C. Samples were removed at specified time intervals and examined for bacterial growth by absorbance measurement at 660 nm and were tested for bacteriocin activity against *L. monocytogenes* ATCC 15313 by the agar well diffusion method.

Partially-purified bacteriocin preparation

Production of carnocin CP5 was previously described (Mathieu *et al.*, 1993b). Partially-purified carnocin CP5 was obtained after ammonium sulphate (Merck) precipitation at 40% saturation. The precipitate, dissolved in Tris-HCl buffer, 50 mmol/l, pH 8.4 (Merck) was further loaded on an anion exchange column (Econo Q, Bio-Rad Lab., Richmond, USA). Fractions containing anti-*Listeria* activity were pooled, sterilized by filtration (Millex GS, 0.22 µm, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) and named partially-purified carnocin CP5. Titre was determined against *L. monocytogenes* ATCC 15313 by critical dilution method as described above. Partially-purified carnocin CP5 was stored frozen at -20°C and used for all the following experiments. Unless otherwise specified, the final concentration of partially-purified carnocin CP5 was 2000 AU/ml.

Adsorption of carnocin CP5 to sensitive and resistant cells

Sensitive and resistant cells from an overnight culture of respectively *L. monocytogenes* ATCC 15313 and *C. piscicola* CP5 were collected by centrifugation, washed twice in salt solution (8.5 g/l NaCl, Merck) and resuspended in this solution to a final concentration of 10^9 cfu/ml. Partially-purified carnocin CP5 was then added to these two cell suspensions. As a control, carnocin CP5 was added to salt solution without cells. Samples were incubated at 30°C and removed after 0, 2, 4, 6, 8 h. After centrifugation, the cell free supernatant fluid was assayed for residual bacteriocin activity by the critical dilution method. Desorption of the bacteriocin from the cells was achieved by a treatment with diluted chlorhydric acid (pH2.0) according to the method of Yang *et al.* (1992).

Effect of carnocin CP5 on growing cells of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in TSYE broth at 30°C

An overnight culture of the indicator strain was used to inoculate 50 ml of TSYE broth to obtain 10^7 cfu/ml. The cell suspension was incubated at 30°C with partially-purified carnocin CP5 added at the beginning of growth or after 4 h 30 min. Samples were withdrawn at different time intervals until 8 h 30 min. Viable counts were determined as described above and absorbance values were measured at 660 nm.

Effect of carnocin CP5 on the growth of L. monocytogenes ATCC 15313 in TSYE broth and in skimmed milk

50 ml of TSYE broth or skimmed milk were inoculated with an overnight culture of L. monocytogenes ATCC 15313 (10^3 cfu/ml) with partially-purified carnocin CP5 added at the beginning of growth. For each incubation temperature test, a control was obtained without bacteriocin addition. The media were then incubated at 7°C and 15°C. Viable cell counts were determined at 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days.

Effect of carnocin CP5 on resting cells of L. monocytogenes ATCC 15313

Cells from an overnight culture of the indicator strain were washed, centrifugated and resuspended into sterile salt solution containing partially-purified carnocin CP5 to obtain 0.13 unit of absorbance. Control was a cell suspension of L. monocytogenes ATCC 15313 without bacteriocin addition. Cell suspensions were incubated at 7°C, 15°C and 30°C. Absorbance values were followed at 660 nm.

Co-culture of L. monocytogenes ATCC 15313 and C. piscicola CP5

Co-culture of L. monocytogenes ATCC 15313 and C. piscicola CP5 was studied in TSYE broth and in skimmed milk. Indicator and producer strains were inoculated in 100 ml TSYE broth or in skimmed milk at a population level of respectively 10^6 cfu/ml and 10^7 cfu/ml. As a control the two strains were also grown separately. Inoculated media were incubated at 4°C, 7°C, 15°C and 30°C. Samples were taken at different time intervals and cell growth was determined by plate counts. Two types of control were used : a Bac⁻ variant having lost the ability to produce carnocin CP5 after treatment of the parental strain with novobiocin and an isolate C. piscicola CP7, that did not produce bacteriocin. Both strains were used in cocultures with the Listeria strain.

Selection of carnocin CP5-resistant variants of Listeria

An overnight culture of L. monocytogenes ATCC 15313 was diluted in tryptone salt (Biokar) from 10^{-1} to 10^{-8} . 0.1 ml of each dilution were plated onto pre-poured 10 ml Listeria Selective Medium plates supplemented with a final concentration of 4000 AU/ml of carnocin CP5. As a control, sterile distilled water took the place of carnocin CP5 in Oxford plates. Agar plates were incubated at 37°C for 48h.

RESULTS

Antilisterial activity

Antimicrobial activity of carnocin CP5 against 13 Listeria strains was demonstrated by the agar well diffusion method (Table I). 11 of the them were inhibited by crude or partially-purified carnocin CP5, excepted L. monocytogenes IP 7831 and L. innocua LMA 21.1, only inhibited by the partially-purified form. L. monocytogenes ATCC 15313 was used as indicator strain for further experiments in relation with its great sensitivity.

Bacteriocin production

Growth of C. piscicola CP5 (Fig.1) occurred in a wide range of incubation temperatures from 4°C to 30°C in TSYE broth, reaching the same final absorbance value, about 1.5 unit and a final pH around 5.0 ± 0.5 . The more the incubation temperature was low the more the cell growth rate was slow. Production of carnocin CP5 was detected early in the log-phase and the maximum activity (1600 AU/ml) was reached in the late phase of growth.

Adsorption of carnocin CP5 to sensitive and resistant cells

The addition of carnocin CP5 to L. monocytogenes ATCC 15313 cells resulted in the decrease of residual activity in the supernatant fluid to 1000 AU/ml within 2 h while the addition of carnocin CP5 to C. piscicola CP5 cells resulted in the decrease of activity of 1000 AU/ml after 6 h of incubation. In control test, no decrease in bacteriocin activity was observed. Carnocin CP5 activity could be released from the sensitive or resistant cells at pH 2.0. Carnocin CP5 was adsorbed aspecifically either by sensitive or resistant cells.

Effect of partially-purified carnocin CP5 on resting cells of L. monocytogenes ATCC 15313

At 30°C (Fig. 2a), the absorbance values at 660 nm linearly decreased from 0.13 to 0.06 unit of over a period of 8 h. At 7°C and 15°C (Fig. 2b and 2c) a similar reduction in absorbance values was observed respectively over a 48 h and a 5 days period. In control samples, at 15°C and 30°C, absorbance values remained unchanged, while at 7°C they slowly decreased showing a spontaneous cell lysis after 5 days in salt solution. Thus a significant cell lysis occurred as a result of treatment with carnocin CP5 on resting cells of L. monocytogenes ATCC 15313.

Effect of partially-purified carnocin CP5 on growing cells of L. monocytogenes ATCC 15313

The effect of carnocin CP5 on sensitive Listeria indicator was examined either in TSYE broth or in skimmed milk.

In TSYE broth, at 30°C, with the addition of carnocin CP5 at the beginning of growth of the indicator organism, the absorbance values at 660 nm remained unchanged. In opposite with the addition of bacteriocin, after 4 h 30 min of growth, absorbance values began to slow down (Fig. 3b). Regarding the viable count, a reduction of 0.5 log cycle occurred within 30 min when carnocin CP5 was added at the beginning of growth and remained stable over a 8 h period. With the addition of bacteriocin after 4 h 30 min of growth, a reduction of approximately 1 log cycle occurred over a 4 h period.

At 15°C (Fig. 4a) the addition of carnocin CP5 induced a reduction of 5 log cycles over a 48 h period, in comparison to the population level of L. monocytogenes ATCC 15313 in the control. However in spite of a residual bacteriocin activity detected in the supernatant fluid, Listeria population grew up, to reach a similar bacterial count than in the control (10^9 cfu/ml) at 7 days of incubation.

At 7°C, in TSYE broth containing carnocin CP5 (Fig. 4b), the population level of L. monocytogenes ATCC 15313 was reduced from $2 \cdot 10^3$ cfu/ml to minus than 10 cfu/ml within 7 days. Non detectable level of L. monocytogenes was observed after 14 days of incubation. In contrast, in the control, population level of Listeria reached 10^9 cfu/ml.

In skimmed milk, at 7°C (Fig. 5b) or 15°C (Fig. 5a), the population levels of L. monocytogenes ATCC 15313 decreased to 5 log cycles respectively, in 5 and 2 days. With a further incubation, the count of indicator strain increased. At 15°C, after 5 days of incubation, maximum bacterial numbers reached 10^8 cfu/ml. At 7°C, after 14 days of incubation, population level was $5 \cdot 10^6$, compared with the population level of 10^9 cfu/ml observed in the control.

Co-cultures of L. monocytogenes ATCC 15313 with C. piscicola CP5

In TSYE broth, at 30°C (Fig. 6a) in the presence of the carnocin CP5 producing strain, inhibition of L. monocytogenes ATCC 15313 growth was observed until 2 days of incubation. Thus the viable number of L. monocytogenes ATCC 15313 in mixed culture was $5 \cdot 10^5$ cfu/ml whereas in pure culture it was $3 \cdot 10^7$ cfu/ml. With longer incubation time, similar counts were obtained in pure culture and in co-culture.

At 7°C (Fig 6b.) the bactericidal effect on L. monocytogenes in co-culture was detectable from 48 h, with a reduction of 4 log cycles in comparison to the population level of L. monocytogenes in pure culture. After 5 days and until 21 days of incubation the viable count of L. monocytogenes in co-culture was reduced to non detectable level, whereas in pure culture it was 10^9 cfu/ml.

At 4°C (Fig. 6c) a reduction in L. monocytogenes ATCC 15313 count of 8 log cycles was observed in co-culture after 21 days of incubation in comparison with the numeration of the pure culture.

In co-culture of L. monocytogenes ATCC 15313, at 7°C, with either a variant Bac⁻ (Fig. 7a) or the non producing strain C. piscicola CP7 (Fig. 7b), no bactericidal action was detectable. However, growth of L. monocytogenes was slowed down.

In skimmed milk, at 15°C (Fig. 8a), co-culture of L. monocytogenes ATCC 15313 with C. piscicola CP5 induced a reduction of Listeria population of 7 log cycles after 21 days of incubation, in comparison with the control. In co-culture at 7°C and 4°C (Fig. 8b, 8c) a reduction of respectively 3 log and 4 log cycles was observed .

Selection of carnocin CP5-resistant variants

The final co-cultures performed in TSYE broth or in skimmed milk were diluted and spread on plates. Single colonies of L. monocytogenes were tested for their susceptibility to carnocin CP5 after spreading on plates containing the bacteriocin (2000 AU/ml). Some of the colonies were still sensitive to carnocin CP5 but others were resistant .

Thus in another experiment, L. monocytogenes ATCC 15313 was tested for its sensitivity to 4000 AU/ml carnocin CP5 by direct plating method. Count of Listeria cells on Listeria Selective Medium agar supplemented with carnocin CP5 was 1.10^7 cfu/ml, while without carnocin CP5 it was $1.6.10^9$ cfu/ml. To determine whether survivors had escaped the effect of carnocin CP5 or were carnocin CP5 spontaneous resistant variants, single colonies of L. monocytogenes ATCC 15313 were selected from Listeria Selective Medium supplemented with carnocin CP5 agar plates at the dilutions 10^{-5} and 10^{-6} . Thirty six isolates were subcultured twice in Oxford agar supplemented with 4000 AU/ml carnocin CP5 and incubated at 37°C for 48h. Among them, 12 did not grow again. The 24 remaining isolates were tested for their carnocin CP5 susceptibility by the agar well diffusion method : five of them were still sensitive to carnocin CP5 and 19 were resistant, even after five successive subcultures on TSYE broth without the presence of bacteriocin.

DISCUSSION

Carnocin CP5 is a bacteriocin produced by C. piscicola CP5 (Mathieu *et al.*, 1993b). This earlier work suggested the occurrence of maximum bacteriocin production in MRS (Biokar) broth regulated at pH 7.0 at 30°C. These conditions were chosen in view of bacteriocin purification experiments. In this present work, since co-cultures C. piscicola CP5 and L. monocytogenes ATCC 15313 were further studied, bacteriocin production was checked in TSYE broth, without pH regulation, from 4°C to 30°C as incubation temperatures. Whatever the incubation temperature, population level of C. piscicola CP5 and bacteriocin production reached the same values. In previously published studies on bacteriocins produced by Carnobacterium spp., incubation temperatures were between 25°C to 30°C (Ahn and Stiles, 1990 ; Schillinger and Holzapfel, 1990 ; Stoffels *et al.*, 1992). Stoffels *et al.* (1992) showed that C. piscicola UI49 did not produce detectable amounts of carnocin UI49 at 4°C.

In this present study, among 13 strains of Listeria spp. tested as indicators by the agar well diffusion method, only two were not inhibited by crude carnocin CP5 extract. Only a few reports indicated inhibitory activity of carnobacteria against Listeria spp. A tenfold concentrated supernatant fluid of C. piscicola LV61 was active against L. monocytogenes DSM 20600 by the agar well diffusion method (Schillinger and Holzapfel, 1990). C. piscicola LK5 inhibited the growth of 17 of 21 strains of Listeria, using a seeded lawn technique (Buchanan and Klawitter, 1992a). Among bacteriocins from lactic acid bacteria, especially the ones produced by two genera Pediococcus and Leuconostoc (Hécharde *et al.*, 1993 ; Mathieu *et al.*, 1993a) showed an antilisterial activity. Recently, some reports mentioned antilisterial activity of bacteriocins from Enterococcus spp. (Parente and Hill, 1992 ; Vilani *et al.*, 1993), Lactobacillus spp. (Atrih *et al.*, 1993 ; Schillinger *et al.*, 1991 ; Sudirman *et al.*, 1993). Nisin produced by some strains of Lactococcus lactis have also proved effective in this respect (Benkerroum and Sandine, 1988).

At any incubation temperatures, with the addition of partially-purified carnocin CP5 (2000 AU/ml) on sensitive cells, several phenomena occurred : an adsorption on L. monocytogenes cells and a cell-death mechanism with a cell lysis. Carnocin CP5 bactericidal action was slow, taking hours rather than minutes to exert its lethal action on L. monocytogenes ATCC 15313. Caseicin 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990) and helveticin V-1829 (Vaughan *et al.*, 1992) are similar to carnocin CP5 in this respect, requiring days to demonstrate the inhibition of growing indicator strains, respectively Lb. casei B109 and Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus 1489.

Lethal effect of carnocin CP5, at 7°C, 15°C and 30°C, was slower at lower temperature but more prolonged. A similar action depending of incubation temperatures was reported for enterocin 1146 (Parente and Hill, 1992). For pediocin PA-1 (Pucci *et al.*, 1988) its efficacy was similar at 4°C or 32°C in APT broth with a visible action in less than 24 h. Carnocin UI49 had a bactericidal effect with a faster killing rate at 34°C than at 30°C and 22°C. At 4°C and 15°C no reduction of viable cells was observed (Stoffels *et al.*, 1992). For carnocin CP5, physiological state of the indicator culture could have a strong influence on its susceptibility to the lethal action of the bacteriocin. Thus carnocin CP5 had a more bactericidal effect on L. monocytogenes ATCC 15313 at 7°C than at 15°C.

In a natural food system such as skimmed milk, bactericidal effect of carnocin CP5 on growing cells of L. monocytogenes ATCC 15313 had a less dramatic effect than the one observed in TSYE broth. Skimmed milk could probably protect the initial sensitive population of indicator strain from carnocin CP5 action. Similar observation was made for enterocin 1146 (Parente and Hill, 1992)

Growth of L. monocytogenes ATCC 15313 was also followed in co-culture with the producer strain C. piscicola CP5. A bactericidal effect on the indicator strain was reported both in TSYE broth and in skimmed milk at various incubation temperatures, with a better killing rate in TSYE broth. Co-culture with Bac⁻ variant or with C. piscicola CP7 isolate did not induce reduction of L. monocytogenes population level. Also acid formation could not be responsible of bactericidal action. Moreover final pH value of 5.0 in a C. piscicola CP5 culture could not inhibit L. monocytogenes ATCC 15313. Reduction of L. monocytogenes count by C. piscicola CP5 was substantially greater at chilled temperatures like 4°C or 7°C. Similar observations were also reported by Buchanan and Klawitter (1992a). Thus, at 19°C, C. piscicola LK5 did not inhibit growth of L. monocytogenes Scott A. At chilled temperatures, the growth rate of C. piscicola was faster than that of L. monocytogenes. So, a significant concentration of bacteriocin was already present at the start of L. monocytogenes growth. Protector effect of skimmed milk already mentioned with carnocin CP5 extract was also observed in co-culture mostly at 4°C and 7°C. In those cases, it would have been necessary to continue the experiments to follow further the two population levels.

Carnocin CP5 extract and C. piscicola CP5 were shown to be efficient to reduce initial counts of L. monocytogenes ATCC 15313 in TSYE broth or in skimmed milk, mostly at chilled temperatures. However, extended incubation with carnocin CP5 or C. piscicola CP5, in TSYE broth or in skimmed milk, showed a re-growth of Listeria cells, in spite of

detection of bacteriocin in broth. This could be probably due to two major phenomena. First, although we detected bacteriocin activity in broth, a partial bacteriocin inactivation could occur by enzymes released in the medium by cell lysis. Second it could be given the hypothesis of the existence of a spontaneous bacteriocin-resistant subpopulation of L. monocytogenes ATCC 15313. In this respect, the presence of spontaneous resistant variants was demonstrated from an initial population of L. monocytogenes. These variants are now investigated to study the resistance mechanism of L. monocytogenes to carnocin CP5. Only a few published reports mentioned the occurrence of spontaneous bacteriocin resistant variants from an initial sensitive population. Harris *et al.* (1991) showed that resistant strains of L. monocytogenes to 50 µg/ml nisin were detected at a frequency of 10^{-6} to 10^{-8} . Recently, in our laboratory, Rekhif *et al.* (1994) have selected different bacteriocin-resistant Listeria variants. Hanlin *et al.* (1993) reported the use of bacteriocins in combination to provide a greater antibacterial activity with variants insensitive either to pediocin AcH or to nisin but never to both. Additional studies could be undertaken to test carnocin CP5 in combination with other anti-Listeria bacteriocins, such as mesenterocin 52 (Mathieu *et al.*, 1993a), curvaticin 13 (Sudirman *et al.*, 1993) and plantaricin C19 (Atrih *et al.*, 1993) that are currently studied in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the "Ministère de l'Agriculture et de la Forêt" (DGAL) for financial support.

REFERENCES

- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990) Plasmid associated bacteriocin production by a strain of Carnobacterium piscicola from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2503-2510.
- Atrih, A., Rekhif, N., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993) Detection and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum C19. *Can. J. Microbiol.* 39, 1173-1179.
- Benkerroum, N. and Sandine, W.E. (1988) Inhibitory action of nisin against Listeria monocytogenes. *J. Dairy Sci.* 71, 3237-3245.

Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1992a) Characterization of a lactic acid bacterium, Carnobacterium piscicola LK5, with activity against Listeria monocytogenes at refrigeration temperatures. J. Food Safety 12, 199-217.

Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1992b) Effectiveness of Carnobacterium piscicola LK5 for controlling the growth of Listeria monocytogenes Scott A in refrigerated foods. J. Food Safety 12, 219-236.

Carosella, J.M. (1990) Occurrence of Listeria monocytogenes in meat and poultry. In A. J. Miller, J.L. Smith, and G. A. Somkuti (eds), Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. Elsevier Science Publishing Co., New York. pp. 165-173.

Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S. and Jones, D. (1987) Classification of Lactobacillus divergens, Lactobacillus piscicola, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, Carnobacterium. Int. J. Sys. Bacteriol. 37, 310-316.

Farber, J.M., Sanders, G.W. and Speirs, J.I. (1990) Growth of Listeria monocytogenes in naturally contaminated raw milk. Lebensm. Wiss. Technol. 23, 252-254.

Farber, J.M. (1991) Listeria monocytogenes in fish products. J. Food Prot. 54, 922-934.

Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P. and Ray, B. (1993) Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. J. Food Prot. 56, 252-255.

Harris, L.J., Fleming, H.P. and Klaenhammer, T.R. (1991) Sensitivity and resistance of Listeria monocytogenes ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to Nisin. J. Food Prot. 54, 836-840.

Héchar, Y., Renault, D., Cenatiempo, Y., Letellier, F., Maftah, A., Jayat, C., Bressolier, P., Ratinaud, M.H., Julien, R., Fleury, Y. and Delfour, A. (1993) Les bactériocines contre Listeria : une nouvelle famille de protéines? Lait 73, 207-213.

Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J. and Fryer, J.L. (1984) Lactobacillus piscicola, a new species from salmonid fish. Int. J. Sys. Bacteriol. 34, 393-400.

Holzappel, W.H. and Gerber, E.S. (1983) Lactobacillus divergens sp. nov., a new heterofermentative Lactobacillus species producing L(+)-lactate. Sys. Appl. Microbiol. 4, 522-534.

Mathieu, F., Sudirman Suwandhi, I., Rekhif, N. Millière, J.B. and Lefebvre, G. (1993a) Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides FR 52. J. Appl. Bacteriol. 74, 372-379.

Mathieu, F., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993b) Properties of a bacteriocin produced by Carnobacterium piscicola CP5. Biotech. Lett. 15, 587-590.

Millière, J.B., Michel, M., Mathieu, F. and Lefebvre, G. (1994) Presence of Carnobacterium spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. J. Appl. Bacteriol. 76, 264-269.

Morgan, S.M. (1992) Potential applications for bacteriocins in the food industry. Farm and Food 2, 14-15.

Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B. and Field, R.A. (1992) Inhibition of Listeria spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici H. J. Food Prot. 55, 337-343.

Parente, E. and Hill, C. (1992a) Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from Enterococcus faecium inhibitory to Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 55, 497-502.

Parente, E. and Hill, C. (1992b) Inhibition of Listeria in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by Enterococcus faecium. J. Food Prot. 55, 503-508.

Pucci, M. J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenberg, P.A. (1988) Inhibition of Listeria monocytogenes by using bacteriocin PA-1 produced by Pediococcus acidilactici PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2349-2353.

Quadri, L., Sailer, M., Roy, K., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1992) Characterization and genetic determinants of bacteriocins produced by Carnobacterium piscicola LV17B. Abstr. P-57 p333. 92nd Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1992.

Rammelsberg, M., Muller, E. and Radler, F. (1990) Caseicin 80 : purification and characterization of a new bacteriocin from Lactobacillus casei. Arch. Microbiol. 154, 249-252.

Rekhif, N., Atrih, A. and Lefebvre, G. (1994). Selection and properties of spontaneous mutants of Listeria monocytogenes ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Current Microbiol. (in Press).

Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (1990) Antibacterial activity of carnobacteria. Food Microbiol. 7, 305-310.

Schillinger, U., Kaya, M. and Lücke, F.K. (1991) Behavior of Listeria monocytogenes in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of Lactobacillus sake. J. Appl. Bacteriol. 70, 473-476.

Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1985) Atypical lactobacilli from vacuum-packaged meats : comparison by DNA hybridization, cell composition and biochemical tests with a description of Lactobacillus carnis sp. nov. Sys. Appl. Microbiol. 6, 291-197.

Stoffels, G., Nes, I.F. and Guomundsdottir, A. (1992) Isolation and properties of a bacteriocin-producing Carnobacterium piscicola isolated from fish. J. Appl. Bacteriol. 73, 309-316.

Sudirman, I., Mathieu, F., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993) Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by Lactobacillus curvatus SB13. Current Microbiol. 27, 35-40.

Vaughan, E.E., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. (1992) Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by Lactobacillus helveticus 1829. J. Appl. Bacteriol. 73, 299-308.

Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. and Coppola, S. (1993) Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by Enterococcus faecalis 226, active against Listeria monocytogenes. J. Appl. Bacteriol. 74, 380-387.

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

Table I : Inhibition of Listeria strains by crude and partially-purified carnocin CP5 measured by the agar well diffusion method

<u>Listeria</u> strains	Source ^b	Incubation Temperature (°C)	Diameter ^a	
			crude ^c	partially-purified ^c
<u>Listeria</u> <u>monocytogenes</u>	ATCC 15313	37	13	17
<u>monocytogenes</u>	IP 7831	37	0	6
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 1	37	12	15
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 2	37	11	15
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 3	37	9	12
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 4	37	12	15
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 5	37	7	12
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 6	37	12	14
<u>monocytogenes</u>	LMA FPM 7	37	10	14
<u>Listeria</u> <u>innocua</u>	LMA 15	37	10	15
<u>innocua</u>	LMA 21.1	37	0	5
<u>innocua</u>	LMA 23.2	37	7	11
<u>Listeria</u> <u>grayi</u>	IP 6818	30	13	16

^a Inhibition diameter in mm. Diameter of wells (5 mm) containing 20 µl of bacteriocin preparation was already subtracted from total inhibition zone.

^b ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA ; IP, Institut Pasteur Collection Paris, France ; LMA, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, ENSAIA, Vandoeuvre, France.

^c carnocin CP5 (see the text)

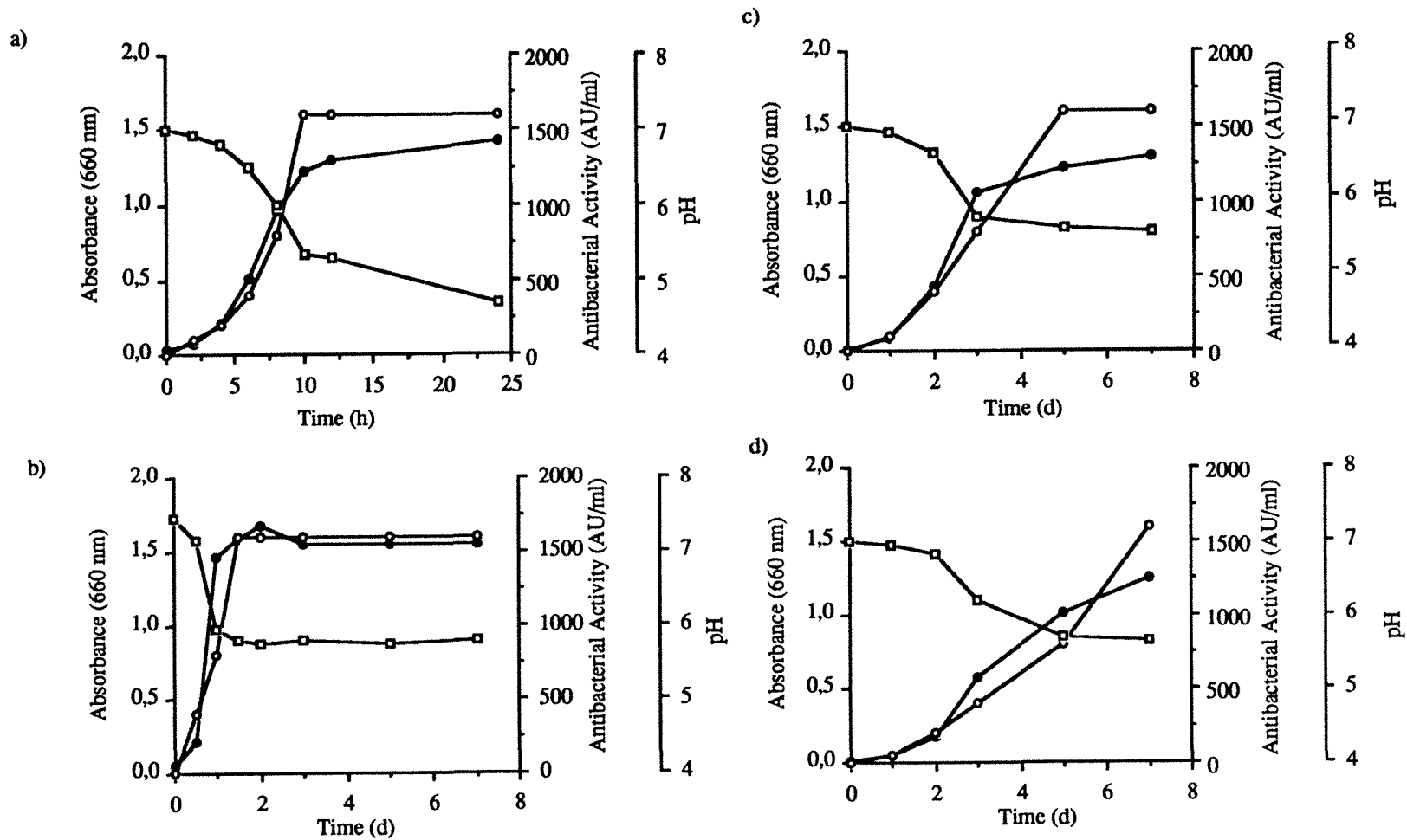


Fig. 1. Production of carnocin CP5 during growth of *C. piscicola* CP5 in TSYE broth at different temperatures.

Growth of *C. piscicola* CP5 (●), changes in pH (□) and production of carnocin CP5 in terms of Arbitrary Units/ml (○) at (a) 30°C ; (b) 15°C ; (c) 7°C and d) 4°C. Indicator organism : *L. monocytogenes* ATCC 15313.

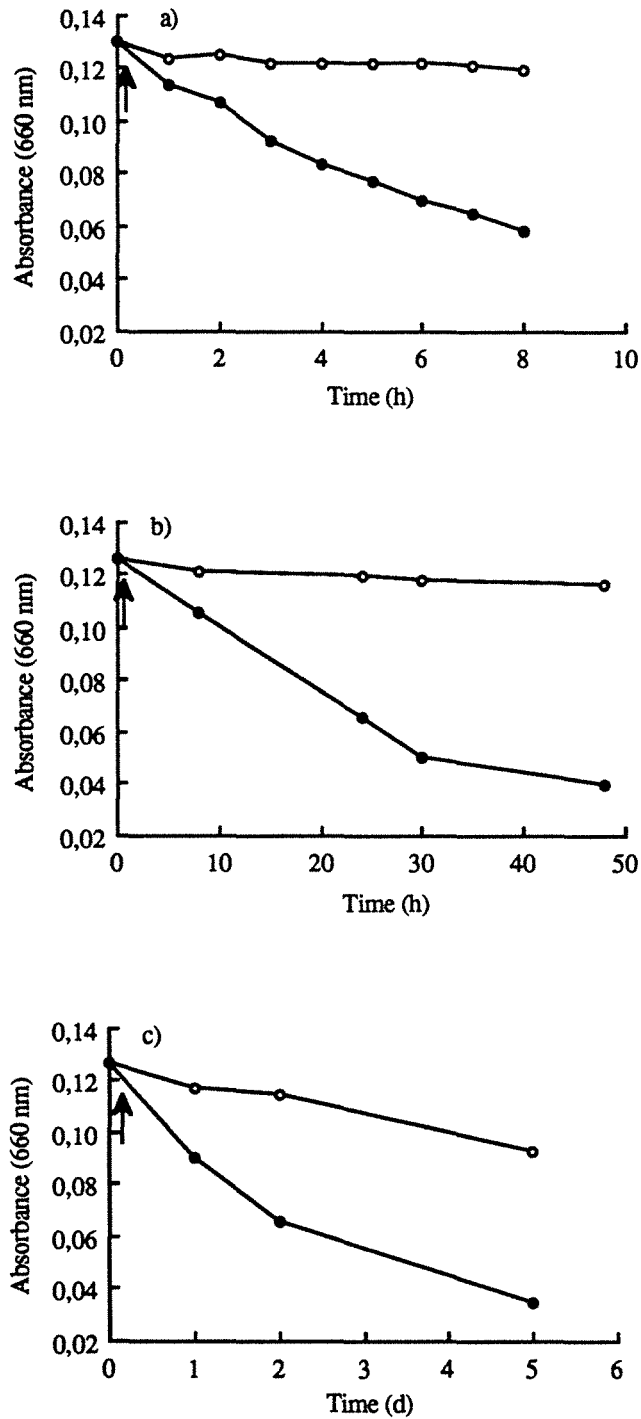


Fig. 2. Effect of partially-purified carnocin CP5 on resting cells of *L. monocytogenes* ATCC 15313 suspended in physiological water at (a) 30°C ; (b) 15°C ; (c) 7°C. Changes in absorbance at 660 nm (○), Control, without bacteriocin addition ; (●) 2000 AU/ml carnocin CP5 ; arrow indicated the addition of carnocin CP5.

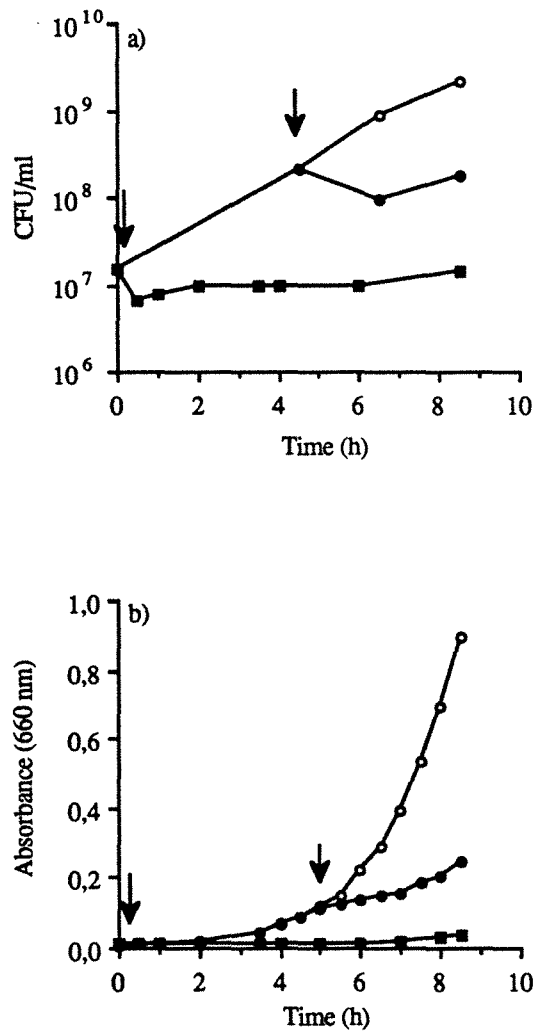


Fig. 3. Effect of partially-purified carnocin CP5 on growing cells of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in TSYE broth at 30°C

(a) Viable count (CFU/ml) measured at selected intervals after inoculation ; (b) Changes in absorbance at 660 nm. (○), Control, without bacteriocin addition ; (■), 2000 AU/ml carnocin CP5 added at T=0 ; (●), 2000 AU/ml carnocin CP5 added after 4h 30min of growth ; arrows indicated the addition of carnocin CP5.

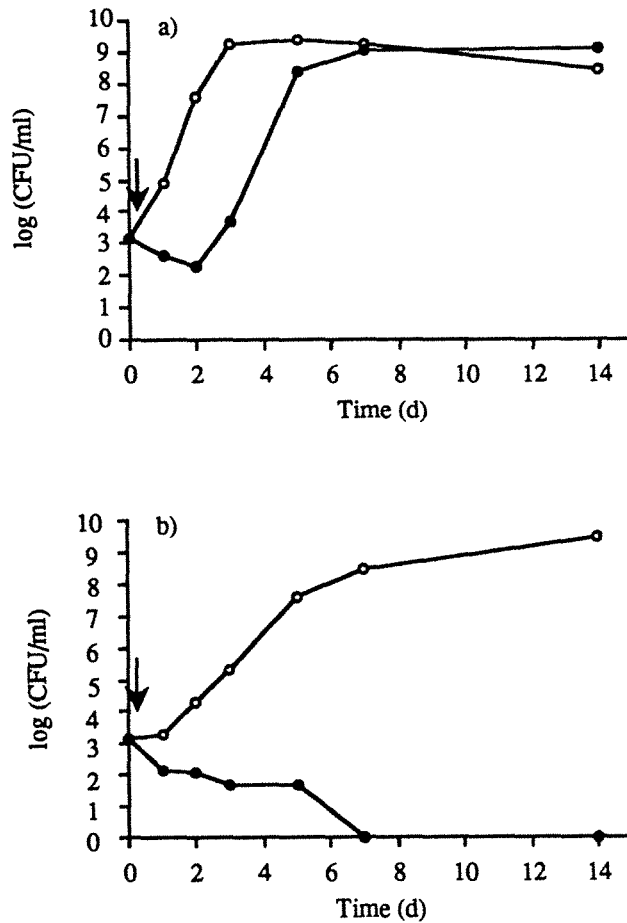


Fig. 4. Effect of partially-purified carnocin CP5 on growing cells of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in TSYE broth at (a) 15°C ; (b) 7°C.

Viable count (CFU/ml) measured at 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14 days. (o), Control, without bacteriocin addition ; (•), 2000 AU/ml carnocin CP5 ; arrow indicated the addition of carnocin CP5.

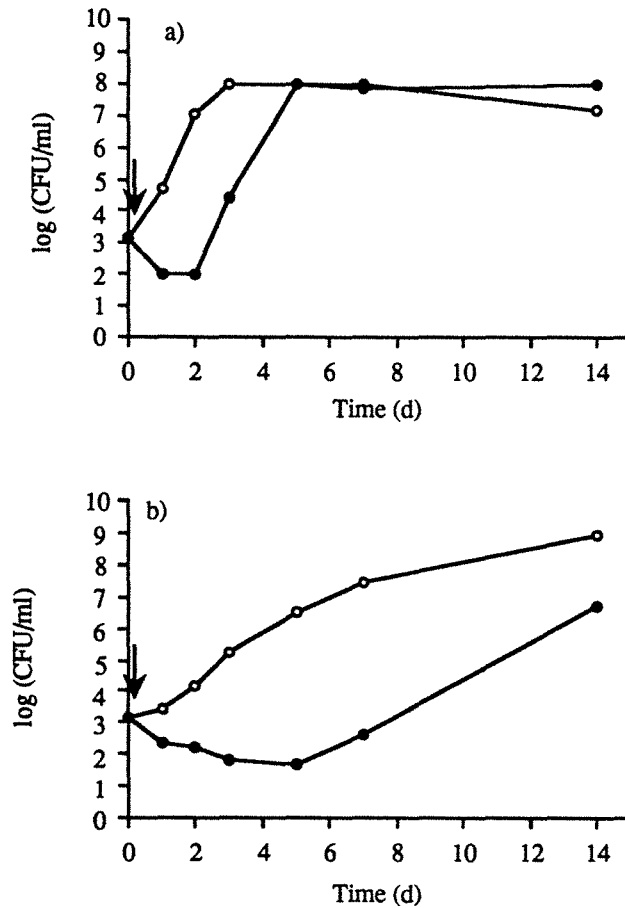


Fig. 5. Effect of partially-purified carnocin CP5 on growing cells of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in skimmed milk at (a) 15°C ; (b) 7°C.

Viable count (CFU/ml) measured at selected intervals (o), Control, without bacteriocin addition; (•) 2000 AU/ml carnocin CP5 ; arrow indicated the addition of carnocin CP5.

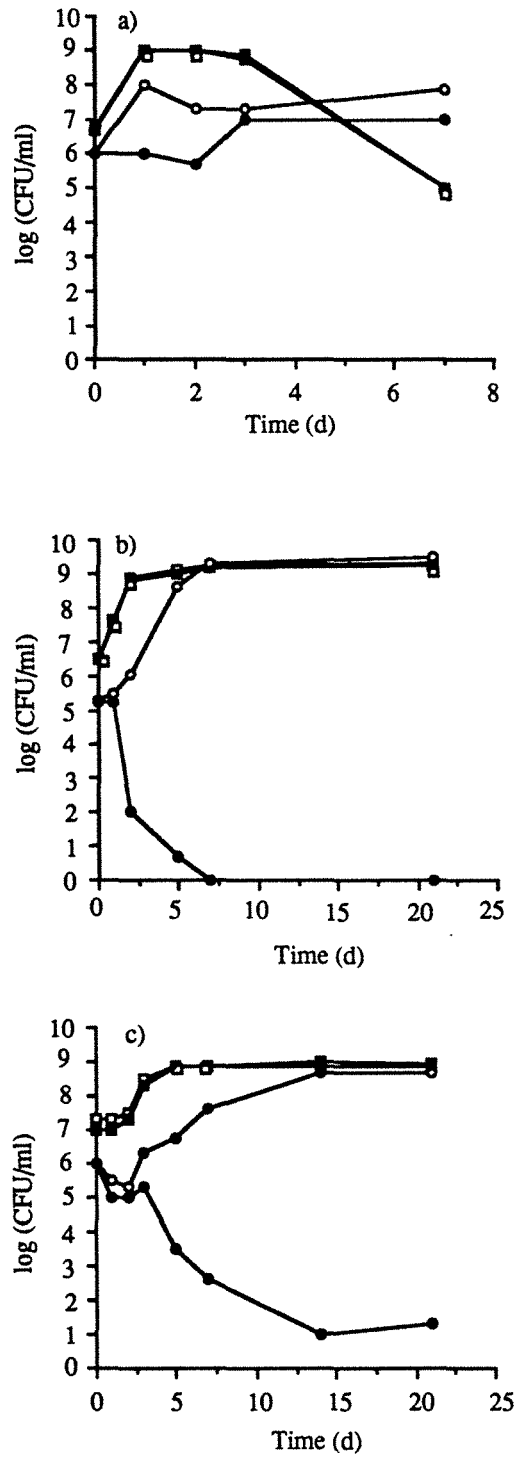


Fig. 6. Growth of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in TSYE broth at a) 30°C ; b) 7°C ; c) 4°C in pure and co-cultures with *C. piscicola* CP5.

Pure cultures of *C. piscicola* CP5 (□) and *L. monocytogenes* ATCC 15313 (○) ; co-cultures of *C. piscicola* CP5 (■) and *L. monocytogenes* ATCC 15313 (●)

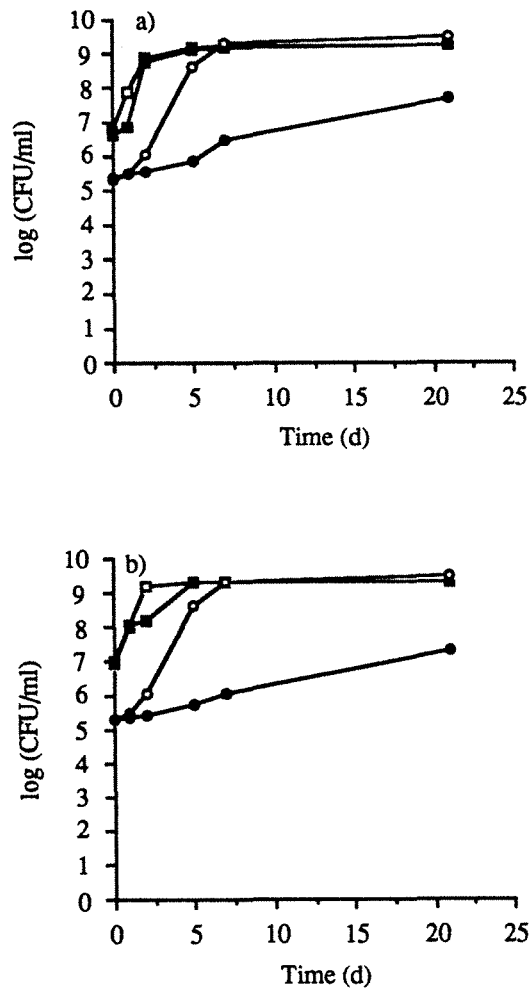


Fig. 7. Growth of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in TSYE broth at 7°C in pure and co-culture with a) the non producer variant *Bac*⁻ ; b) the non producing strain CP7.

Pure cultures of the non producer variant *Bac*⁻ or the non producer strain *C. piscicola* CP7 (\square) and *L. monocytogenes* ATCC 15313 (\circ) ; co-cultures of non producer variant *Bac*⁻ or non producer strain (\blacksquare) and *L. monocytogenes* ATCC 15313 (\bullet).

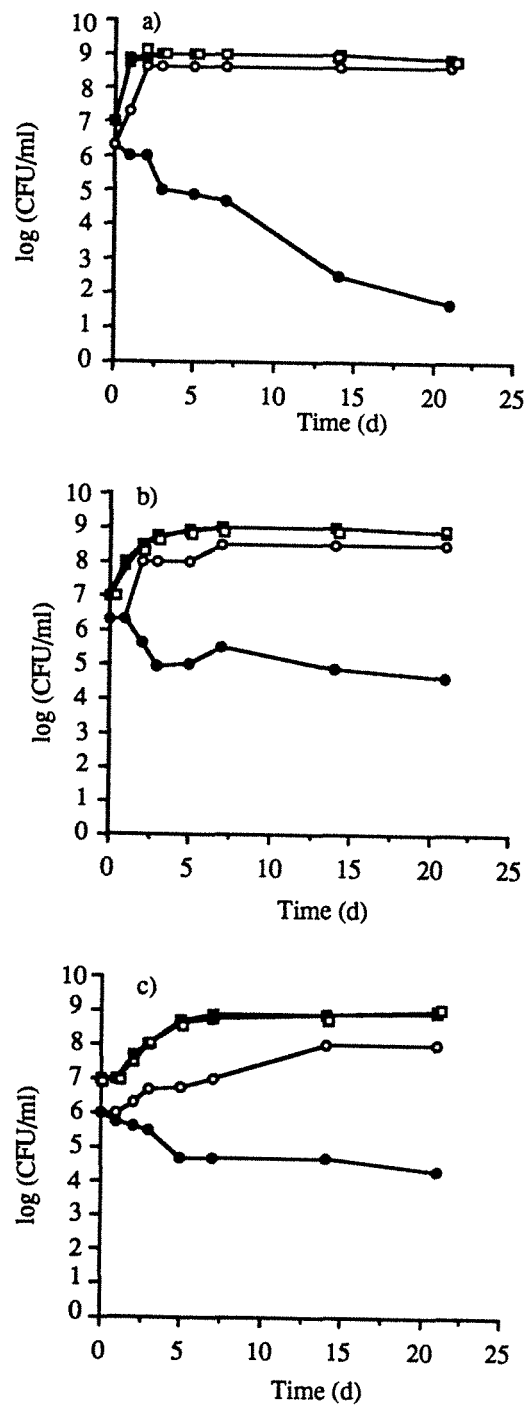


Fig. 8. Growth of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in skimmed milk at (a) 15°C ; (b) 7°C ; (c) 4°C in pure and co-cultures with *C. piscicola* CP5.

Pure cultures of *C. piscicola* CP5 (□) and *L. monocytogenes* ATCC 15313 (○) ; co-cultures of *C. piscicola* CP5 (■) and *L. monocytogenes* ATCC 15313 (●)

CONCLUSION

CONCLUSION

Ce travail a permis non seulement de mettre en évidence dans les fromages la présence de souches appartenant au nouveau genre bactérien *Carnobacterium* mais aussi d'apporter des éléments sur la production de bactériocines, par l'isolat *Carnobacterium piscicola* CP5 étudié ici et par d'autres isolats de *Carnobacterium* étudiés au laboratoire.

Les bactéries du genre *Carnobacterium*, comme ce nom l'indique, avaient été, jusqu'à présent, isolées de produits carnés : viande (Holzapfel et Gerber, 1983 ; Shaw et Harding, 1984), poisson (Hiu *et al.*, 1984 ; Stoffels *et al.*, 1992 ; Pilet *et al.*, 1993) et particulièrement lorsque ces produits carnés sont conservés sous atmosphère modifiée (enrichie en CO₂) ou sous vide et à une température de réfrigération (Collins *et al.*, 1987). Au laboratoire de microbiologie de l'ENSAIA, à la suite de l'analyse de la flore microbienne de cinq fromages à pâte molle, de type Brie, en fin d'affinage, 36 souches appartenant à un groupe bactérien dominant (de 1.10⁸ à 1.10⁹ ufc.g⁻¹ de produit) ont été isolées. Ces isolats de bactéries lactiques présentant des caractéristiques communes particulières (psychrotrophie, acido-sensibilité) n'ont pu être identifiés à aucune espèce du genre *Lactobacillus* et ont été appelés provisoirement "lactobacilles atypiques". Le recours à une hybridation ADN/ADN a permis finalement d'identifier ce groupe bactérien au genre *Carnobacterium* (33 isolats à l'espèce *C. piscicola* et 3 à l'espèce *C. divergens*). La présence des carnobactéries dans les produits laitiers fermentés n'avait encore jamais été mentionnée dans la littérature. Il est maintenant possible de comprendre pourquoi. Cela apparaît lié aux milieux sélectifs, Rogosa et MRS, utilisés habituellement pour l'isolement des bactéries lactiques des produits laitiers ; ceux-ci ne sont pas adaptés aux exigences des carnobactéries. Une amélioration de la détection des carnobactéries dans les produits laitiers peut être l'utilisation de milieux moins sélectifs, ajustés à un pH initial de l'ordre de 8.0 à 9.0 (Holzapfel, 1992) avec une incubation à basse température. Dans les cinq fromages analysés en fin d'affinage, les carnobactéries représentaient la flore psychrotrophe dominante. Aucun de ces fromages ne présentait de défauts organoleptiques. Les carnobactéries pourraient être présentes dans le lait cru réfrigéré en tant que flore naturelle psychrotrophe. Au cours de la fabrication des fromages, leur croissance, ralentie à des pH acides (4.5-5.0), pourrait s'accélérer lors de l'affinage quand le pH du milieu remonte et au cours de leur éventuelle conservation au froid dans les circuits de distribution. Ces différents points mériteraient d'être vérifiés dans l'avenir.

Les surnageants de culture des 36 carnobactéries ont été testés pour leur production éventuelle de bactériocine. L'isolat *C. piscicola* CP5 a été retenu lors de ce criblage pour son action contre les autres carnobactéries. Cette activité anti-bactérienne a été nommée provisoirement carnocine CP5. Les principales caractéristiques de celle-ci ont été déterminées

La carnocine CP5 se différencie des autres bactériocines des carnobactéries décrites dans la littérature au niveau du spectre d'activité anti-bactérienne (cf p 27). Au sein du genre *Lactobacillus*, la carnocine CP5 est active seulement contre l'espèce thermophile *Lb. delbrueckii*. Elle est également active contre des espèces des genres *Enterococcus* et *Listeria* et enfin contre les carnobactéries de référence ainsi que d'autres carnobactéries isolées des fromages.

Au niveau de ses propriétés physico-chimiques, la nature protéique de la carnocine CP5 a été vérifiée par le traitement du surnageant de culture de *C. piscicola* CP5 avec différentes enzymes protéolytiques. Alors que la carnocine CP5 est sensible à l'ensemble des enzymes protéolytiques testées (protéinase K, pronase E, trypsine, α -chymotrypsine, ficine, thermolysine, pepsine à pH 3.0), elle est insensible à la protéase XIII. C'est aussi le cas de la carnocine UI49 (Stoffels *et al.*, 1992a) et de la bactériocine de *C. piscicola* LV17 (Ahn et Stiles, 1990b). De plus, les enzymes non protéolytiques (amylase, phospholipase, lipase) ne réduisent pas l'activité de la carnocine CP5 dans un surnageant de culture, comme c'est le cas aussi pour les autres bactériocines des carnobactéries. La carnocine CP5 est stable sur une gamme de pH de 2.0 à 10.0 et n'est pas détruite après 1 h à 100°C à pH 7.0. Ce sont des caractéristiques communes avec les autres bactériocines des carnobactéries (Schillinger et Holzapfel, 1987 ; Stoffels *et al.*, 1992a).

La faible croissance des carnobactéries sur le milieu MRS à pH non régulé est apparemment due à l'association pH acide et présence d'acide acétique, association qui est également retrouvée dans le milieu Rogosa. L'acétate n'empêcherait pas la croissance des carnobactéries sous sa forme dissociée, mais l'acide acétique non dissocié serait inhibiteur. Une croissance rapidement stoppée dès que le pH arrive à 5.0) de *C. piscicola* CP5 ainsi qu'une faible production de carnocine CP5 sur un milieu EB (Trypcase soja, 30 g.l⁻¹, complémenté en extrait de levure, 6 g.l⁻¹) ont nécessité l'optimisation des conditions de culture avant d'aborder la purification de la carnocine CP5. Ces observations sont directement liées au caractère non acidurique des carnobactéries (Collins *et al.*, 1987) nécessitant la culture de l'isolat *C. piscicola* CP5 en fermenteur, pour réguler le pH à une

valeur proche de la neutralité. Ainsi après plusieurs essais, la production de la carnocine CP5 est favorisée dans un milieu MRS dont le pH est régulé à 7.0.

Dans un surnageant de culture, la carnocine CP5 se présenterait sous forme d'agrégats actifs ayant un PM apparent d'environ 30 kDa, déterminé par filtration sur gel. Sous l'action d'un agent dénaturant non ionique, l'urée, à une concentration finale de 8 mol.l⁻¹ dans un surnageant de culture, ces agrégats se dissocieraient en plus petites sous unités actives ayant alors un PM inférieur à 6 kDa (déterminé par rapport au volume d'élution de l'aprotinine en filtration sur gel). La réalisation d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) a permis d'estimer le PM du monomère de la carnocine CP5 (précipitée à 40% de saturation en sulfate d'ammonium) entre 3 et 5 kDa. Ainsi, par deux techniques différentes, la filtration sur gel et l'électrophorèse SDS-PAGE et avec deux types d'agents dénaturants, l'un non ionique (l'urée), l'autre ionique (le SDS), la dissociation de la carnocine CP5, en plus petites sous unités actives a été démontrée. L'agrégation de la bactériocine elle même ou avec d'autres molécules, puis sa dissociation en plus petites sous unités actives, est une caractéristique souvent rencontrée au sein des bactériocines des bactéries lactiques (Mordvedt *et al.*, 1991 ; Muriana et Klaenhammer, 1991 ; Benoit *et al.*, 1994 ; Sudirman *et al.*, 1993) mais non précisée jusqu'à présent chez celles produites par le genre *Carnobacterium*.

La purification de la carnocine CP5 a été réalisée par l'utilisation de techniques courantes utilisées pour la purification des protéines : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie en basse pression sur des résines échangeuses d'ions et sur des résines permettant des interactions hydrophobes et enfin chromatographie haute pression en phase inverse sur colonne hydrophobe.

La production de la carnocine CP5 a été effectuée sur 5 litres d'un milieu 1/2 MRS, pour limiter l'apport de polypeptides extracellulaires, complétement en extrait de levure (2.5 g.l⁻¹) et en Tween 80 (0.5 ml.l⁻¹). Le surnageant de culture a été obtenu après une fermentation régulée à pH 7.0 pendant 13 heures. Le protocole de purification mis en place a conduit à l'obtention de la carnocine CP5, à la fin du protocole de purification, sous deux pics d'activité, CP51 et CP52, élués sur colonne C₈, sous l'effet respectivement de 27% et 30% d'acétonitrile + 0.1% de TFA. Pour le moment, seul le pic CP51 a été exploité et seulement 0.15% d'activité anti-*Listeria* ont été récupérés en fin de protocole avec une augmentation de l'activité spécifique de 1200 fois. Ce faible rendement peut trouver une partie de son explication dans le protocole de purification choisi dans lequel, à plusieurs étapes, l'activité est dispersée en plusieurs fractions du fait de l'hétérogénéité du

comportement de la préparation native de la carnocine CP5 semi-purifiée. Le séquençage du pic CP51 selon la méthode récurrente d'Edman n'a permis jusqu'à présent que de déterminer une séquence partielle de l'extrémité N-terminale : 2 HN-X-Ileu-(Pro?)-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr-. Après le neuvième résidu, aucun dérivé phénylthiohydantoïne supplémentaire n'a été obtenu, malgré plusieurs cycles de dégradation. Dans l'avenir, il faudra déterminer si ce blocage est dû ou non à la présence de résidus acides aminés particuliers ou modifiés.

Dans cette séquence partielle, il faut noter la présence d'une séquence "consensus" -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-, également rencontrée chez d'autres bactériocines de bactéries lactiques ayant notamment une activité anti-*Listeria* (Fig. 1). Actuellement le rôle de cette séquence consensus n'est pas connu. Une hypothèse a été émise sur la relation structure - activité anti-*Listeria* (Tichaczek *et al.*, 1992). Parmi les bactériocines des carnobactéries, cette séquence consensus est retrouvée chez les carnobactériocines B, BM1 et B2 (Quadri *et al.*, 1993) mais non chez la carnobactériocine A, qui, d'ailleurs, n'a pas d'activité anti-*Listeria*.

L'étude du déterminisme génétique de la production de la carnocine CP5 a été abordée par l'obtention de variants non producteurs après croissance de la souche parentale sur un milieu contenant un agent de curage plasmidique, la novobiocine (5 µg/ml). Les deux variants obtenus sont non producteurs et sensibles à la carnocine CP5. L'analyse comparée de leur profil d'ADN plasmidique avec celui de la souche parentale laisse supposer l'intervention de la bande d'ADN plasmidique pML6, de taille supérieure à 16 kpb, à la fois dans la production et dans la résistance à la bactériocine. La localisation plasmidique des gènes de production et de résistance a déjà été indiquée pour différentes souches productrices de bactériocines : *Lb. sake* (Schillinger et Lücke, 1989 ; Mordvedt et Nes, 1990) et *Ln. gelidum* (Hastings *et al.*, 1991). Parmi les carnobactéries, *C. piscicola* LV17 produit deux bactériocines, les carnobactériocines A et B (Worobo *et al.*, 1993 et Quadri *et al.*, 1993). Le plasmide pCP49 est le support génétique de la production de la carnobactériocine A. Le variant LV17B produit en fait deux bactériocines (BM1 et B2) dont le support génétique est respectivement le chromosome et le plasmide pCP40. La synthèse d'une sonde oligonucléotidique marquée, correspondant à la séquence N-terminale de la carnocine CP5, vient d'être effectuée en vue de son utilisation comme sonde pour la confirmation de la localisation plasmidique des gènes de production de la bactériocine, puis ensuite de la détection de fragments de restriction portant les gènes Bac⁺ ; ceci en vue du clonage de ces fragments.

Le mode d'action de la carnocine CP5 sur *L. monocytogenes* ATCC 15313 se manifeste par une adsorption de la carnocine CP5 sur les cellules cibles, puis un effet bactéricide caractérisé par une diminution de la population initiale de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en croissance, et une lyse cellulaire mise en évidence par une diminution de l'absorbance à 660nm des suspensions de cellules non proliférantes.

L'effet bactéricide de la carnocine CP5 est un processus lent qui n'est visible qu'après plusieurs minutes à 30°C et plusieurs heures à 15°C ou 7°C. A 30°C, l'effet bactéricide, observé au bout de 30 minutes n'est pas total ; il est finalement suivi par une reprise de la croissance de *L. monocytogenes*. A 7°C, aucune reprise de croissance n'est observée même après 21 jours d'incubation. En revanche, sur du lait, la reprise de croissance est visible après 5 jours d'incubation. L'effet protecteur du lait, rendant moins efficace l'action de la carnocine CP5, a été également mentionné dans le cas de l'entérocoque 1146 (Parente et Hill, 1992).

Parmi les bactériocines à activité anti-*Listeria* (Tableau 2, p 25-26), certaines comme la plantaricine C19 (Atrih *et al.*, 1993b) et la leucocine A UAL-187 (Hasting et Stiles, 1991) sont bactériostatiques. D'autres, comme la mésentéricine Y105 (Hécharde *et al.*, 1992b) et la pédiocine PA-1 (Pucci *et al.*, 1988) sont bactéricides ou bactériolytiques (comme la sakacine P et la curvacine A : Tichaczek *et al.*, 1992). Parmi les bactériocines des carnobactéries, le mode d'action des carnobactériocines BM1 et B2 anti-*Listeria* n'a pas été précisé à notre connaissance (Quadri *et al.*, 1993) ; il en est de même pour la carnobactériocine A (Worobo *et al.*, 1993). La carnocine UI 49 est bactériolytique sur sa souche cible *L. lactis* NCDO 497 (Stoffels *et al.*, 1992a). L'effet est visible rapidement en moins d'une heure et principalement à 34°C.

Des essais de cocultures entre *C. piscicola* CP5 et *L. monocytogenes* ATCC 15313 ont été réalisés dans un milieu EB ou sur du lait. Un effet bactéricide est observé, plus marqué sur milieu EB que sur lait, et d'autant plus important que la température est basse (7°C et 4°C). Cela a été également observé dans le cas de la coculture de *C. piscicola* LK5 et *L. monocytogenes* Scott A (Buchanan et Klawitter, 1992a ; Buchanan et Klawitter, 1992b). Cela peut être lié au taux de croissance supérieur du genre *Carnobacterium* par rapport au genre *Listeria* à des températures de réfrigération, avec une production de bactériocine, dans le milieu, avant le démarrage de la phase exponentielle de croissance de *Listeria*. Dans notre cas il a été vérifié que l'effet bactéricide observé en coculture ne peut être relié à l'acidité produite par *C. piscicola* CP5 lors de sa croissance. En effet, la coculture avec un variant non producteur de bactériocine n'entraîne pas de réduction de la population de *L.*

monocytogenes ATCC 15313. Un retard dans la croissance est cependant présent, dû peut être à un phénomène de compétition entre les deux souches (Juillard *et al.*, 1987) ou à d'autres inhibiteurs.

Que ce soit avec la carnocine CP5 partiellement purifiée ou avec la souche productrice *C. piscicola* CP5, lorsque l'incubation se prolonge, et même en présence de bactériocine dans le milieu, une reprise de croissance de *L. monocytogenes* ATCC 15313 est observée. A partir d'une population sensible de *L. monocytogenes*, nous avons démontré qu'il était possible de sélectionner une sous population résistante à la carnocine CP5. Ceci expliquerait la "reprise" de croissance en fin de culture. La présence de résistants spontanés au sein d'une population sensible a déjà été rapportée dans le cas de l'action de la nisine vis-à-vis de *L. monocytogenes* (Harris *et al.*, 1993) et également dans notre laboratoire pour plusieurs bactériocines anti-*Listeria* qui y sont actuellement étudiées (Rekhif *et al.*, 1994). L'utilisation de deux bactériocines en combinaison pourrait être une solution si le mécanisme de résistance d'une souche cible à une bactériocine est différent de celui pour l'autre bactériocine. Dans ce sens, les travaux récents de Hanlin *et al.* (1993) avec la nisine et la pédiocine AcH, en combinaison, sont prometteurs .

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

Ce travail permet d'envisager des travaux de recherche futurs tant sur la physiologie de *C. piscicola* CP5 que sur l'étude plus approfondie de sa (ses) bactériocine(s).

Le genre *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987) présente encore des incertitudes quant à la connaissance exacte de son type fermentaire (fermentation homo ou hétérolactique). Dans ce sens, il serait nécessaire de doser les enzymes clés intervenant lors de la fermentation du glucose à savoir la 6-phosphofructokinase pour la glycolyse EMP (voie de l'homofermentation) et la 6-phosphocétolase pour la voie de l'hétérofermentation. La détection de l'une de ces deux enzymes permettrait de préciser la voie fermentaire empruntée par ce genre bactérien. Les caractères de psychrotrophie et d'acido-sensibilité des carnobactéries, non habituels chez la plupart des bactéries lactiques, mériteront aussi d'être étudiés de façon plus approfondie.

L'ensemble des molécules correspondant à l'activité anti-bactérienne appelée carnocine CP5, produite par l'isolat *C. piscicola* CP5, n'a été purifiée qu'en partie. L'objectif principal à court terme est de continuer l'exploitation des deux pics d'activité CP51 et CP52 séparés par HPLC. Ces deux pics représentent-ils deux bactériocines distinctes, codées par deux gènes différents, produites par la même souche ? S'agit-il de remaniements post-traductionnels qui conduisent la molécule à se présenter sous deux formes différentes ? La poursuite de la recherche de la structure de ces molécules devrait apporter des éléments de réponse à ces questions.

Grâce à la connaissance de la séquence partielle N-terminale de la molécule correspondant au pic CP51, une sonde oligonucléotidique correspondante a été synthétisée. Elle va permettre la réalisation d'hybridations avec le matériel génétique (plasmides et chromosome) de l'isolat *C. piscicola* CP5 pour localiser les gènes Bac⁺ et peut-être confirmer que la bande plasmidique pML6 est le support génétique de production et de résistance. Par la suite le clonage du gène est envisagé ainsi que son séquençage.

L'étude du mode d'action de la carnocine CP5 pourrait s'orienter dans diverses directions :

- connaissances fondamentales sur les mécanismes d'action : mesure de force proton motrice et étude des flux ioniques induits au niveau de la souche cible après contact avec la carnocine CP5 ; mécanismes provoquant la lyse des cellules cibles.

- étude des variants résistant de *Listeria* obtenus lorsque l'incubation en présence de carnocine CP5 se prolonge. Le caractère résistant est-il stable ? Ces résistants sont-ils modifiés génétiquement ? En ce qui concerne les applications, l'utilisation de deux bactériocines en combinaison pourrait peut être limiter la sélection de variants résistants si le mécanisme de résistance d'une souche cible à une bactériocine est différent de celui pour l'autre bactériocine. Dans ce sens, les travaux récents de Hanlin *et al.* (1993) avec la nisine et la pédiocine AcH, en combinaison, sont prometteurs. Comme au laboratoire nous disposons de plusieurs bactériocines anti-*Listeria*, de tels essais pourront être envisagés.

- poursuivre les essais d'incorporation de *C. piscicola* CP5 dans des produits alimentaires plus complexes, comme par exemple la fabrication fromagère, en vue de limiter la croissance de *Listeria monocytogenes*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990a) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* **69** : 302-310.
- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990b) Plasmid associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 2503-2510.
- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1992) Mobilization and expression of bacteriocin plasmids from *Carnobacterium piscicola* isolated from meat. *J. Appl. Bacteriol.* **73** : 217-228.
- Atrih, A., Rekhif, N., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993a) Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios* **75** : 117-123.
- Atrih, A., Rekhif, N., Millièrè, J.B. and Lefebvre, G. (1993b) Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19 strain. *Can. J. Microbiol.* **39** : 1173-1179.
- Axelsson, L., Holck, A., Birkeland, S.E., Aukrust, T. and Blom, H. (1993) Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* Lb706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2868-2875.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. (1983) Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 1808-1815.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. (1984) Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother* **26** : 328-334.
- Barnes, E.M. (1976) Microbiological problems of poultry at refrigerator temperatures. A review. *J. Sci. Food Agric.* **27** : 777-782.
- Benoit, V., Mathis, R., Lefebvre, G. (1994) Characterization of brevicin 27, a bacteriocin synthesized by *Lactobacillus brevis* SB27. *Curr. Microbiol.* **28** : 51-56.

- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. (1987) Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Ind Microbiol* **2** : 319-322
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65** : 261-268.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. (1991) Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* **70** : 25-33.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. (1991) Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1265-1267.
- Borch, E. and Molin, G. (1988) Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. *Antonie v. Leeuwenhoek.* **54** : 301-323.
- Brooks, J.L., Moore, A.S., Patchett, R.A., Collins, M.D. and Kroll, R.G. (1992) Use of the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes for the rapid detection and identification of *Carnobacterium* species from meat. *J. Appl. bacteriol.* **72** : 294-301.
- Brosius, J., Palmer, J.L., Kennedy, J.P. and Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** : 4801-4805.
- Buchanan R.L. and Klawitter, L.A. (1990) Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **12** : 235-245.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1992a) Characterization of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Food Safety* **12** : 199-217.

Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1992b) Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in refrigerated foods. J. Food Safety **12** : 219-236.

Champomier, M.C., Montel, M.C. and Talon, R. (1989) Nucleic acid relatedness studies on the genus *Carnobacterium* and related taxa. J. Gen. Microbiol. **135** : 1391-1394.

Chikindas, M.L., Garcia-Garcera, M.J., Driessen, A.J.M., Lebedoer, AAT.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N. and Venema, G. (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Appl. Environ. Microbiol. **59** : 3577-3584.

Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Ferusu, S. and Jones, D. (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. Int. J. Sys. Bacteriol. **37** : 310-316.

Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M. and Wallbanks, S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Letters, **77** : 5-12.

Cossart, P. and Mengaud, J. (1989) *Listeria monocytogenes* a model system for the molecular study of intracellular parasitism. Mol. Biol. Med. **6** : 463-474.

Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroix, C. (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environ. Microbiol. **55** : 1329-1333.

Daeschel, M.A. and Klaenhammer, T.R. (1985) Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. **50** : 1538-1541.

De Bruyn, I.N., Holzapfel, W.H., Visser, L. and Louw, A.J. (1988) Glucose metabolism by *Lactobacillus divergens*. J. Gen. Microbiol. **134** : 2103-2109.

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23** : 130-135.

Desmazeaud, M. (1992) 1-Les bactéries lactiques. In "Les groupes microbiens d'intérêt laitier" Partie I : "Les germes utiles". Coordonnateurs : Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F. Ed. CEPIL, Paris, pp 9bis-58.

Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C.M. and Le Pennec, J.P. (1991) Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J. Gen. Microbiol.* **137** : 2423-2429.

Farber, J.M. and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55** : 476-511.

Food and Drug Administration (1988) Nisin preparation : affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* **53** : 11247

Franzmann, P.D., Höpfl, P., Weiss, N. and Tindall, B.J. (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica ; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **156** : 255-262.

Gao, F.H., Abee, T. and Konings, W.N. (1991) Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2164-2170.

Gasson, M.J. (1980) Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **29** : 99-102.

Gill, G.O. (1976) Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bact.* **41** : 401-410.

Grimont, F. and Grimont, P.A.D. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur* **137** : 165-175.

Hammes, W.P., Weiss, N. and Holzappel, W. (1992) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In "The prokaryotes" Second Edition edited by Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., Springer Verlag New York, vol II, **70** : 1536-1594.

Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P. and Ray, B. (1993) Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* **56** : 252-255.

Harris, L.J., Fleming, H.P. and Klaenhammer, T.R. (1991) Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to Nisin. *J. Food Prot.* **54**, 836-840.

Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173** : 7491-7500

Hastings, J.W. and Stiles, M.E. (1991) Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70** : 127-134

Hécharde, Y., Dérijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. (1992a) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.* **138** : 2725-2731.

Hécharde, Y., Jayat, C., Letellier, F., Julien, R., Cenatiempo, Y., Ratinaud, M.H. (1992b) On-line visualization of the competitive behavior of antagonistic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 3784-3786.

Henderson, J.T., Chopko, A.L. and van Wassenaar, P.D. (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* **295** : 5-12.

Hitchener, B.J., Egan, A.F. and Rogers, P.J. (1982) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* **52** : 31-37.

Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J. and Fryer, J.L. (1984) *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **34** : 393-400.

Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.E., Aukrust, T. and Blom, H. (1992) Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* **138** : 2715-2720.

Holzappel, W.H. and Gerber, E.S. (1983) *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(-)-lactate. *Sys. Appl. Microbiol.* **4** : 522-534.

Holzappel, W.H. (1992) Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **17** : 113-133.

Hurst, A. (1981) Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27** : 85-123.

Ingram, L. (1969) Synthesis of the lantibiotic nisin : formation of lanthionine and β -methyl-lanthionine. *Biochem. Biophys. Acta.* **184** : 216-219.

Jager, K. and Harlander, S. (1992) Characterization of a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PC and comparison of bacteriocin-producing strains using molecular typing procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** : 631-637.

Jimenez-Diaz, R., Piard, J.C., Ruiz-Barba, J.L. and Desmazeaud, M.J. (1990) Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. Third Symposium on lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87** : 91.

Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167** : 439-446.

Juillard, V., Spinnler, H.E., Desmazeaud, M.J., Boquien, C.Y. (1987) Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le Lait* **67** : 149-172.

- Kaletta, C. and Entian, K.D. (1989) Nisin, a peptide antibiotic : cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of the peptide product. *J. Bacteriol.* **171** : 1597-1601.
- Kanatani, K., Tahara, T., Yoshida, K., Miura, H., Sakamoto, M. and Oshimura, M. (1992) Plasmid-associated bacteriocin production by and immunity of *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56** : 648-651.
- Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie v. Leeuwenhoek.* **49** : 209-224.
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986) Regular, non-sporing Gram-positive rods, p. 1208-1234. In : P.H.A. Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. William and Wilkins, Baltimore.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70** : 337-349.
- Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : 39-86.
- Konisky, J. (1982) Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.* **36** : 125-144.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 6955-6959.
- Larsen, A.G., Vogensen, F.K. and Josephsen, J. (1993) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs : purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 113-122.
- Lewis, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J. (1991) Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1683-1688.

Lewus, C.B. and Montville, T.J. (1992) Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. *Food Biotechnol.* **6** : 153-174.

Lewus, C.B., Sun, S. and Montville, T.J. (1992) Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 143-149.

Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87** : 149-164.

London, J. (1976) The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Ann. Rev. Microbiol.* **30** : 279-301.

Maftah, A., Renault, D., Vignoles, C., Héchard, Y., Bressolier, P., Ratinaud, M.H., Cenatiempo, Y. and Julien, R. (1993) Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *J. Bacteriol.* **175** : 3232-3235.

Marugg, J.D. (1991) Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnol.* **5** : 305-312.

Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledebouer, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M. Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C.M. and Vandenberg, P.A. (1992) Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2360-2367.

Mathieu, F., Sudirman Suwandhi, I., Rekhif, N., Millière, J.B., Lefebvre, G. (1993a) Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52. *J. Appl. Bacteriol.* **74** : 372-379

Mathieu, F., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993b) Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnol. Lett.* **15** : 587-590.

- Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A. and Lefebvre, G. (1994a) Effect of carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in physiological water, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. Accepted for publication in "Int. J. Food Microbiol." N° MS 998/93
- Mathieu, F., Mathis, R., Lebrihi, A. and Lefebvre, G. (1994b) Characterization and plasmid-linkage of carnocin CP5, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. (unpublished data)
- Mauguin, S., Rolland, M., Masson, P. and Mescle, J.F. (1993) Effect du pH, du glucose, du sel et de la température sur la croissance de souches de *Carnobacterium* isolées de poisson. Microbiol. Aliments Nutrition **11** : 71-78.
- Millière, J.B., Michel, M., Mathieu, F., Lefebvre, G. (1994) Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. J Appl Bacteriol (in press)
- Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J. and Champomier, M.C. (1991) A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. J. Appl. Bacteriol. **70** : 469-472.
- Mortvedt, C.I. and Nes, I.F. (1990) Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* L45. J. Gen. Microbiol. **136** : 1601-1607
- Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Nes, I.F. (1991) Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 1829-1834
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. (1991) Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 114-121.
- Niemand, J.G. and Holzapfel, W.H. (1984) Characteristics of lactobacilli isolated from radurised meat. Inter. J. Food Microbiol. **1** : 99-110.
- Orla-Jensen, S. (1919) The lactic acid bacteria. Host and Son, Copenhagen.

Parente, E. and Hill, C. (1992) Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.* **55** : 503-508.

Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J. and Desmazeaud, M. (1990) Evidence for a bacteriocin by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.* **44** : 143-158.

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

Pilet, M.F., Piard, J.C., Desmazeaud, M., Novel, G. and Dousset, X. (1993) Evidence for a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* isolated from fish products. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G21, *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : 127.

Pucci, J.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenberg, P.A. (1988) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 2349-2353.

Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1993) Purification, cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G34, *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : 133.

Ray, S.K., Johnson, M.C. and Ray, B. (1989) Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. *J. Indus. Microbiol.* **4** : 163-171.

Ray, B. (1992) Pediocin (s) of *Pediococcus acidilactici* as a food biopreservative. In : *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Ed. Ray, B. and Daeschel, M. CRC Press Inc., Florida. pp 265-322.

Rekhif, N., Atrih, A. and Lefebvre, G. (1994) Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.* (in press in vol. **28**)

Reuter, G. (1975) Classification problems, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products, p. 221-229. In : J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting (ed.), *Lactic acid bacteria in beverages and food*. Academic Press, London.

Reuter, G. (1981) Psychrotrophic lactobacilli in meat products, p. 253-258. In : T.A. Roberts, G. Hobbs, J.H.B. Christian and N. Skovgaard (ed.), *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity*. Academic Press, London.

Reuter, G. (1983) *Lactobacillus alimentarius* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus farciminis* sp. nov., nom. rev. *System. Appl. Microbiol.* **4** : 277-279.

Rogosa, M., Mitchell, J.A. and Wiseman, R.F. (1951) A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* **62** : 132-133.

Ruhr, E. and Sahl, H.G. (1985) Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemoter* **27** : 841-845.

Schillinger, U. and Holck, A. (1993) Characterization and purification of a new bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* LV61. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G2, *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : 117.

Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (1990) Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiol.* **7** : 305-310.

Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1987) Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* **4** : 199-208.

Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 1901-1906.

Schleifer, K.H. (1987) Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **46** : 201-203.

Scopes, R.K. (1988) Methods for measuring protein concentration. In *Protein Purification. Principles and Practice*, pp. 278-283. Edited by C.R. Cantor. New York : Springer Verlag.

Sharpe, M.E. (1962a) Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Sci. Abstr.* **24** : 109-118.

Sharpe, M.E. (1962b) Enumeration and studies of lactobacilli in food products. *Dairy Sci. Abstr.* **24** : 165-171.

Sharpe, M.E. (1979) Lactic acid bacteria in the dairy industry. *J. Soc. Dairy Tech.* **32** : 9-18.

Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1984) A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. bacteriol.* **56** : 25-40.

Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1985) Atypical lactobacilli from vacuum-packaged meats : comparison by DNA hybridization, cell composition and biochemical tests with a description of *Lactobacillus carnis* sp. nov. *Sys. Appl. Microbiol.* **6** : 291-197.

Sobrino, O.J., Rodriguez, J.M., Moreira, W.L., Fernandez, M.F., Sanz, B. and Hernandez, P.E. (1992) Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.* **16** : 215-225.

Steen, M.T., Chung, Y.J. and Hansen, J.N. (1991) Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1181-1188.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.R. and Klaenhammer, T.R. (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 3613-3617.

Stoffels, G., Nes, I.F. and Guomundsdottir, A. (1992a) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* **73** : 309-316.

- Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H., Nes, I.F. (1992b) Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1417-1422
- Sudirman, I., Mathieu, F., Michel, M. and Lefebvre, G. (1993) Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Current Microbiol.* **27** : 35-40.
- Sudirman, I., Mathieu, F., Benoit, V. and Lefebvre, G. (1994) Properties of two bacteriocins synthesized by *Leuconostoc* strains. *Curr. Microbiol.* (in press in vol. **28**)
- Tagg J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Rev.* **40** : 722-756.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29** : 807-813.
- Thornley, M.J. (1957) Observations on the microflora of minced chicken meat irradiated with 4MeV cathode rays. *J. Appl. Bacteriol.* **20** : 286-298.
- Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F. and Vogel, R.F. (1992) Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *System. Appl. Microbiol.* **15** : 460-468.
- Upreti, G.C. and Hinsdill, R.D. (1975) Production and mode of action of lactocin 27 : bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7** : 139-145.
- Van Laack, R.L.J.M., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (1992) Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. *Int. J. Food Microbiol.* **16** : 183-195
- Vaughan, E.E., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. (1992) Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* **73** : 299-308.

Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A. and Collins, M.D. (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. Inter. J. Syst. Bacteriol. **40** : 224-230.

Worobo, R.W., Roy, K.L., Sailer, M., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1993) Genetic determinants of carnobacteriocin A and the development of a food grade vector for multiple bacteriocin expression. Fourth symposium on Lactic acid bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, 5-9 sept. 1993. Poster G33, FEMS Microbiol. Rev. **12** : 133.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DESCHAMPS Alain, Professeur, ISTAB/Université
Bordeaux I,**

Monsieur NOVEL Georges, Professeur, Université de Caen.



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle MATHIEU Florence

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etude des propriétés d'une bactériocine anti-listéria, biosynthétisée
par une souche de carnobactérium"**

en vue de l'obtention du titre de :

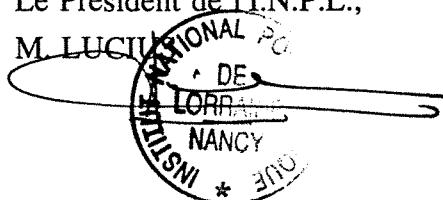
**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, 27 Janvier 1994

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIEN



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

RESUME

Un isolat de *Carnobacterium piscicola* codé CP5, provenant d'un fromage à pâte molle en fin d'affinage, exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de certaines bactéries à Gram positif, notamment des bactéries phylogénétiquement proches (autres souches de *Carnobacterium*). Cette activité, nommée carnocine CP5, est détruite par des protéases ou par autoclavage en milieu alcalin. En présence d'agents dissociant les complexes protéiques, l'activité apparaît liée à une molécule ayant un PM apparent compris entre 3 et 5 kDa. Le caractère producteur de carnocine CP5 peut être perdu après curage d'ADN plasmidique. L'ensemble des caractères précédents indique que l'action serait due à une molécule de type bactériocine. Elle exerce une action bactéricide, avec lyse des cellules, sur plusieurs souches de *Listeria monocytogenes*, aussi bien en croissance, qu'à l'état non proliférant. La molécule responsable de l'activité, après production en fermenteur dans un milieu régulé à pH 7.0, a pu être purifiée en plusieurs étapes : précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographies d'échanges d'ions puis d'interactions hydrophobes et finalement CLHP en phase inverse. Cette dernière technique a permis de séparer deux fractions purifiées actives notées CP51 et CP52. Une partie de la séquence N-terminale en acides aminés de la molécule présente dans la fraction CP51, déterminée par dégradation récurrente d'Edman, a pu être établie : elle contient notamment une séquence -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val- déjà trouvée récemment par d'autres auteurs dans des bactériocines de certaines bactéries présentant une activité anti-*Listeria*.