



**HAL**  
open science

# **Carnobacterium maltaromaticum : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère**

Hélène Carole Edima

► **To cite this version:**

Hélène Carole Edima. Carnobacterium maltaromaticum : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL056N . tel-01752849

**HAL Id: tel-01752849**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752849>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

NANCY-UNIVERSITE, FRANCE  
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE  
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires  
Laboratoire de Science et Génie Alimentaires

UNIVERSITE DE NGAOUNDERE, CAMEROUN  
Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles  
Laboratoire de Microbiologie

---

**THESE**

Présentée devant l'Institut National Polytechnique de Lorraine  
en vue d'obtenir les grades de

Docteur de l'INPL et Docteur/PhD de l'Université de Ngaoundéré  
*Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires*

par

**Hélène Carole Edima**

---

***Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et  
potentialités en technologie fromagère**

---

Soutenue publiquement à l'INPL le 20 septembre 2007 devant la commission d'examen

**Rapporteurs**

Paul Henri Amvam Zollo, Professeur, Recteur de l'Université de Ngaoundéré  
Pascal Degraeve, Maître de conférences à l'Université Claude Bernard 1, Bourg-en-Bresse

**Examineurs**

Jean-François Cavin, Professeur à L'ENS.BANA à Dijon  
François-Xavier Etoa, Professeur à l'Université de Yaoundé 1 (Directeur de thèse)  
Carl Moses Mbofung, Professeur, Directeur de L'ENSAI de Ngaoundéré (Directeur de thèse)  
Jean-Bernard Millière, Professeur, LSGA, ENSAIA-INPL (Directeur de thèse)



## **Avant-propos**

Les travaux consignés dans ce mémoire de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA) de l'ENSAIA-INPL de Nancy. Je remercie le Professeur Stéphane Désobry pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

J'exprime ma vive reconnaissance au Professeur Jean-Bernard Millière (IUT Nancy-Brabois, UHP-Nancy 1), Directeur de recherche au LSGA, équipe de Microbiologie Alimentaire, qui a accepté de diriger ce travail. Je le remercie, ainsi que Madame Catherine Cailliez-Grimal (Maître de conférences à l'IUT Nancy-Brabois), pour leur disponibilité, leurs conseils, leurs qualités humaines et surtout pour la confiance qu'ils m'ont accordés.

Mes remerciements s'adressent également à messieurs les professeurs François-Xavier Etoa (Faculté des sciences de l'Université de Yaoundé 1) et Carl Moses Mbofung (Directeur de l'ENSAI de l'Université de Ngaoundéré) d'avoir accepté de diriger ce travail. Je tiens à les remercier pour la confiance qu'ils m'ont accordée, leurs encouragements, et leurs conseils.

J'exprime également ma gratitude à Madame Anne-Marie Revol-Junelles, maître de conférences à l'ENSAIA-INPL, qui a toujours accordé beaucoup d'attention à mon travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à Messieurs les Professeurs Paul Henri Amvam Zollo, Pascal Degraeve et Jean-François Cavin qui ont accepté de juger ce travail.

Merci à Mesdames Sylvie Banon-Désobry (Maître de conférences à l'IUT Nancy-Brabois) et Muriel Jacquot (maître de conférences à l'ENSAIA-INPL), au Professeur Michel Linder (Directeur de recherche au LSGA) et à Monsieur Emmanuel Rondags (maître de conférences à l'ENSAIA-INPL). Leur aide et leur conseil m'ont été très précieux.

J'associe à mes remerciements la Société Bongrain-Gérard SAS qui a réalisé des fabrications de fromages à pâte molle au sein de son laboratoire R&D au Tholy et qui a également mis en place et participé aux séances de dégustation.

Je remercie également les personnes qui ont participé de près ou de loin à cette étude ; Mlles Michèle Turban et Carine, Mme Delphine Roger, Mrs. Ahanda Antoine, Jordane, Aboubakar, Abdou bouba, et tout le personnel du LSGA, sans oublier les stagiaires. Qu'ils soient toutes assurés de ma sympathie.

Maintenant, comment exprimer ma reconnaissance à mes parents, à la famille Bekono Messanga Siméon, à la famille Jourdan Roland, à la famille Toulou Bidima Pascal, à Mr. Joachim Ndi, dont le soutien m'a été tellement précieux ? Je leur dédie cette thèse dont ils sont aussi les auteurs et les acteurs.

Et enfin, que dire à Joël et à Merveille qui ont subi le pire...Recevez ici le témoignage de toute ma gratitude et de tout mon amour.



## Table des matières

Liste des publications et communications (Annexe 5).....	-i-
Liste des tableaux.....	-ii-
Liste des figures.....	-iv-
Liste des abréviations.....	-vii-
Introduction.....	-1-
<b>Chapitre I. Revue bibliographique.....</b>	<b>-5-</b>
<b>I.1. Les bactéries lactiques .....</b>	<b>- 0 -</b>
I.1.1. Connaissances générales .....	- 5 -
I.1.2. Intérêts des bactéries lactiques .....	- 6 -
I.1.3. Le genre <i>Carnobacterium</i> .....	- 7 -
I.1.3.1. Systématique bactérienne .....	- 7 -
I.1.3.2. Caractères physiologiques .....	- 8 -
I.1.3.3. Production de bactériocines .....	- 8 -
I.1.3.4. Habitats du genre <i>Carnobacterium</i> .....	- 12 -
I.1.3.5. Position taxonomique.....	- 13 -
<b>I.2. Méthodes d'identification de <i>Carnobacterium</i> sp.....</b>	<b>- 14 -</b>
I.2.1. Identification génotypique du genre <i>Carnobacterium</i> .....	- 14 -
I.2.2. Identification phénotypique du genre <i>Carnobacterium</i> .....	- 15 -
I.2.2.1. Intérêt des différents constituants du milieu de culture .....	- 16 -
<b>I.3. Le fromage et les bactéries lactiques .....</b>	<b>- 17 -</b>
I.3.1. Le fromage .....	- 17 -
I.3.2. Incidence des bactéries lactiques atypiques en fabrication fromagère.....	- 18 -
I.3.3. Présence opportuniste de <i>C. maltaromaticum</i> dans des fromages .....	- 20 -

<b>I.4. Production de composés sapides par des bactéries lactiques.....</b>	<b>- 20 -</b>
I.4.1. Hydrolyse du lactose et des lipides .....	- 21 -
I.4.2. Métabolisme des acides aminés .....	- 22 -
<i>I.4.2.1. Les composés aromatiques dans les fromages.....</i>	<i>- 25 -</i>
I.4.3. Les bactéries lactiques et composés aromatiques .....	- 27 -
<i>I.4.3.1. Production de composés maltés par C. maltaromaticum.....</i>	<i>- 28 -</i>
I.4.4. Application en industrie fromagère.....	- 28 -
I.4.5. Les amines biogènes.....	- 29 -
<i>I.4.5.1. Rôle des amines biogènes.....</i>	<i>- 30 -</i>
<i>I.4.5.2. Toxicité des amines biogènes .....</i>	<i>- 31 -</i>
I.4.6. Les bactéries impliquées dans la production des amines biogènes .....	- 31 -
<b>I.5. Texture du gel lactique .....</b>	<b>- 33 -</b>
I.5.1. Acidification du lait.....	- 33 -
I.5.2. Détermination des propriétés rhéologiques.....	- 34 -
<b>Chapitre II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>-36-</b>
<b>II.1. Techniques de microbiologie .....</b>	<b>- 36 -</b>
II.1.1. Souches bactériennes .....	- 36 -
II.1.2. Préparation de l'inoculum.....	- 36 -
II.1.3. Milieux de culture .....	- 37 -
<i>II.1.3.1. Bouillon de laboratoire TSB-YE.....</i>	<i>- 37 -</i>
<i>II.1.3.2. Lait.....</i>	<i>- 37 -</i>
<i>II.1.3.3. Milieux de dénombrement.....</i>	<i>- 37 -</i>
II.1.4. Elaboration du milieu sélectif pour <i>Carnobacterium</i> sp.....	- 38 -
<i>II.1.4.1. Caractéristiques du milieu.....</i>	<i>- 38 -</i>
<i>II.1.4.2. Antibiogramme.....</i>	<i>- 38 -</i>
<i>II.1.4.3. pH et températures d'incubation .....</i>	<i>- 39 -</i>
II.1.5. Plans d'expériences selon la matrice de Doehlert.....	- 40 -
<i>II.1.5.1. Plan de Doehlert à trois facteurs.....</i>	<i>- 41 -</i>

II.1.5.2. Analyses statistiques et graphiques .....	- 41 -
II.1.5.3. Méthodologie des surfaces de réponse .....	- 42 -
II.1.6. Plan d'expériences incluant les antibiotiques .....	- 43 -
II.1.7. Validation du milieu sélectif de numération pour <i>C. maltaromaticum</i> .....	- 44 -
II.1.7.1. Vis-à-vis de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28.....	- 44 -
II.1.7.2. Vis-à-vis d'un consortium de souches présentes dans l'environnement fromager .....	- 44 -
II.1.8. Cinétiques d'acidification de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, de <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 et de <i>S. thermophilus</i> INRA 302 en culture pure.....	- 44 -
II.1.8.1. En TSB-YE .....	- 45 -
II.1.8.2. En lait.....	- 45 -
II.1.9. Cinétique d'acidification de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 en co-culture avec <i>Lc.</i> <i>lactis</i> DSM 20481 ou avec <i>S. thermophilus</i> INRA 302 dans du lait .....	- 45 -
II.1.10. Impact de la combinaison pH-température sur la cinétique d'acidification du lait par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 et <i>S. thermophilus</i> INRA 302 (plan d'expériences) .....	- 46 -
II.1.11. Recherche de bactériocines produites par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28.....	- 47 -
II.1.11.1. Méthode de détection en milieu solide.....	- 47 -
II.1.12. Analyse bactériologique des fromages .....	- 48 -
<b>II.2. Techniques de biochimie.....</b>	<b>- 49 -</b>
II.2.1. Profil carboné de <i>C. maltaromaticum</i> (LMA 28, « Réo », « Pérail » et DSM 20730 <sup>T</sup> ) sur galeries API 50 CHL .....	- 49 -
II.2.2. Dosages du glucose, du galactose, du fructose, du lactose et de l'acide lactique en milieu TSB-YE .....	- 49 -
II.2.2.1. A l'aide de kits enzymatiques .....	- 49 -
II.2.2.2. Par chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	- 50 -
II.2.3. Profils enzymatiques de <i>C. maltaromaticum</i> (LMA 28 « Réo » « Pérail » et DSM 20730 <sup>T</sup> ), de <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 et de <i>S. thermophilus</i> INRA 302.....	- 50 -
II.2.3.1. Sur galerie API ZYM.....	- 50 -
II.2.3.2. Sur milieux gélosés spécifiques.....	- 51 -
II.2.3.3. Recherche de l'activité $\beta$ -galactosidasique .....	- 52 -

---

II.2.4. Production de composés aromatiques par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 et <i>S. thermophilus</i> INRA 302.....	- 53 -
II.2.4.1. Dosage de composés aromatiques.....	- 53 -
II.2.5. Dosage des amines biogènes.....	- 54 -
II.2.5.1. Dansylation.....	- 54 -
II.2.5.2. Dosage par HPLC.....	- 55 -
<b>II.3. Techniques rhéologiques.....</b>	<b>- 55 -</b>
II.3.1. Détermination de paramètres rhéologiques de laits acidifiés par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 et <i>S. thermophilus</i> INRA 302.....	- 55 -
<b>II.4. Evaluation sensorielle.....</b>	<b>- 57 -</b>
II.4.1. Préparation des solutions.....	- 57 -
II.4.2. Entraînement du jury.....	- 58 -
<b>II.5. Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>- 58 -</b>
II.5.1. Extraction de l'ADN bactérien.....	- 58 -
II.5.1.1. A partir d'une colonie.....	- 58 -
II.5.1.2. A partir d'un bouillon de culture.....	- 58 -
II.5.1.3. A partir du fromage.....	- 59 -
II.5.2. Amplification par PCR avec les amorces spécifiques de genre Cb1/Cb2R et d'espèce Cpis/23S-7 : identification génotypique de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28....	- 59 -
II.5.3. Recherche de <i>C. maltaromaticum</i> dans 30 fromages français.....	- 60 -
II.5.4. Amplification par PCR des gènes impliqués dans la production des carnobactériocines B2 et BM1.....	- 62 -
II.5.5. Electrophorèse en gel d'agarose.....	- 62 -
<b>II.6. Fabrications fromagères.....</b>	<b>- 63 -</b>
II.6.1. Fabrication des « petits suprêmes vitalité » 10 Mai 2005.....	- 63 -

II.6.1.1. Préparation du levain <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 .....	- 63 -
II.6.1.2. Préparation du lait de fabrication .....	- 63 -
II.6.1.3. Ensemencement et emprésurage du lait de fabrication .....	- 64 -
II.6.2. Fabrication de « Montagnard », 25 avril 2007 .....	- 65 -
II.6.3. Evaluation sensorielle des fromages .....	- 66 -
<b>Chapitre III. Identification de <i>C. maltaromaticum</i>.....</b>	<b>-67-</b>
<b>III.1. Elaboration d'un milieu de numération sélectif pour <i>Carnobacterium</i> sp. ....</b>	<b>- 68 -</b>
III.1.1. Effet inhibiteur du pH entre 6,8 et 9,4 en milieu TSA-YE.....	- 68 -
III.1.2. Effet inhibiteur de la gentamicine et de la vancomycine à pH 8,8 en milieu TSA-YE.....	- 69 -
III.1.3. Plan d'expériences .....	- 70 -
III.1.3.1. Equations polynomiales représentant les réponses expérimentales .....	- 75 -
III.1.3.2. Etude du chemin optimal .....	- 77 -
III.1.4. Validation du milieu <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (MCM).....	- 81 -
III.1.4.1. <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> LMA 28 .....	- 81 -
III.1.4.2. Cocktail de souches bactériennes.....	- 82 -
<b>III.2. Optimisation de la technique de PCR pour l'identification de <i>C. maltaromaticum</i> .....</b>	<b>- 83 -</b>
III.2.1. Identification de <i>Carnobacterium</i> sp.....	- 83 -
III.2.2. Optimisation de la méthode de PCR par l'augmentation de la concentration en MgCl <sub>2</sub> .....	- 85 -
III.2.3. Validation de la technique de PCR sur la recherche de <i>C. maltaromaticum</i> dans 30 fromages français.....	- 86 -
<b>III.3.. Recherche de bactériocines produites par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 .....</b>	<b>- 87 -</b>
III.3.1. Activité antibactérienne .....	- 87 -
III.3.2. Identification des bactériocines produites par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 ..	- 88 -

---

**Chapitre IV: Métabolisme fermentaire.....-89-**
**IV.1. Métabolisme glucidique .....- 90 -**

IV.1.1. Profils carbonés de *C. maltaromaticum* LMA 28, *C. maltaromaticum* «Réo», *C. maltaromaticum* «Pérail», *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> sur galeries API 50 CHL ... - 90 -

IV.1.2. Cinétiques d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE .....- 91 -

IV.1.3. Dosage du glucose, du galactose, du fructose, du lactose et de l'acide lactique....- 93 -

IV.1.3.1. *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 .....- 93 -

IV.1.3.2. *Streptococcus thermophilus* INRA 302 .....- 95 -

**IV.2.. Activités enzymatiques.....- 96 -**

IV.2.1. Profil enzymatique .....- 96 -

IV.2.2. Activité lipolytique.....- 98 -

IV.2.3. Activité protéolytique (caséinolytique) .....- 99 -

**IV.3. Cinétiques d'acidification dans du lait.....- 99 -**

IV.1. Comparaison du profil d'acidification des quatre souches de *C. maltaromaticum*...- 99 -

IV.3.2. Cinétique d'acidification du lait par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la concentration en extrait de levure.....- 101 -

IV.3.3. Comparaison du profil d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28, de *S. thermophilus* INRA 302 et de *Lc. lactis* DSM 20481 .....- 102 -

IV.3.4. Cinétique d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la charge bactérienne initiale .....- 103 -

IV.3.4.1. Dans le lait.....- 103 -

IV.3.4.2. Dans le lait supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure .....- 104 -

IV.3.5. Impact de la combinaison pH-température sur la cinétique d'acidification du lait-YE par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302 .....- 105 -

IV.3.5.1. Températures « chaudes » .....	- 105 -
IV.3.5.2. « Températures froides » .....	- 113 -
IV.3.6. Comportement de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 en co-culture avec <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 dans du lait-YE .....	- 114 -
IV.3.7. Comportement de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 en co-culture avec <i>S. thermophilus</i> INRA 302 dans du lait-YE .....	- 117 -
<b>IV.4. Paramètres rhéologiques des gels produits par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 et <i>S. thermophilus</i> INRA 302.....</b>	<b>- 119 -</b>
IV.4.1. La souche <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28.....	- 119 -
IV.4.2. La souche <i>S. thermophilus</i> INRA 302.....	- 120 -
<b>Chapitre V: Composés aromatiques et amines biogènes.....</b>	<b>-122-</b>
<b>V.1. Dosage de composés aromatiques.....</b>	<b>- 123 -</b>
V.1.1. Dosage du 3-méthylbutanal, du 2-méthylbutanal et du 2-méthylpropanal produits par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 en TSB-YE .....	- 123 -
V.1.2. Dosage du 3-méthylbutanal, du 2-méthylbutanal et du 2-méthylpropanal, produits par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 dans le lait.....	- 125 -
V.1.3. Effet de l'ajout des précurseurs d'arômes dans du lait sur la production du 3-méthylbutanal par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 .....	- 127 -
V.1.4. Dosage du 3-méthylbutanal dans du lait supplémenté avec les co-facteurs à pH acide et à pH basique .....	- 129 -
V.1.5. Production du 3-méthylbutanal par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 et <i>S. thermophilus</i> INRA 302 .....	- 131 -
<b>V.2. Recherche de la tyramine et de l'histamine .....</b>	<b>- 133 -</b>

**Chapitre V: Aptitude fromagère.....-135-****VI.1. Aptitude fromagère de *C. maltaromaticum* LMA 28.....- 136 -**

VI.1.1. Analyses bactériologiques des fromages.....- 136 -

VI.1.1.1. Les «Petit suprême vitalité », fabrication du 10 mai 2005.....- 136 -

VI.1.1.2. « Le Montagnard » fabrication du 25 avril 2007.....- 137 -

VI.1.2. Analyse sensorielle de fromages .....- 139 -

VI.1.2.1. Les « Petit suprêmes vitalité » .....- 139 -

VI.1.2.2. « Le Montagnard » .....- 141 -

**Conclusion générale.....-142-**

1. Choix de la souche d'intérêt .....- 143 -

2. Performances acidifiantes de *C. maltaromaticum* LMA 28 .....- 144 -3. Inconvénients de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 .....- 145 -4. Réponse de *C. maltaromaticum* LMA 28 au stress acide.....- 145 -5. Aptitude fromagère de *C. maltaromaticum* LMA 28 .....- 146 -6. Production de composés à arôme malté par *C. maltaromaticum* LMA 28 .....- 147 -7. Potentialités de *C. maltaromaticum* en technologie fromagère.....- 147 -**Références bibliographiques.....-147.-****Annexe 1. Chemins optima.....-159-****Annexe 2. Etapes de la fabrication des "petits suprême vitalité".....-161-****Annexe 3. Aspect des "petit suprême vitalité" pendant le stockage.....-162-****Annexe 4. Fiches de dégustation des fromages.....-163-****Annexe 5. Publication sur le milieu MCM.....-165-****Annexe 6. Publication sur la présence de *C. maltaromaticum* dans les fromages ...-170-**

## Liste des publications et des communications

### 1. Publications dans des revues à comité de lecture

**Edima H. C.**, Cailliez-Grimal C., Revol-Junelles A.-M., Tonti L., Linder M., and Millière J.-B. (2007) "A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*". *Journal of Microbiological Methods* (68): 516-521.

Cailliez-Grimal C., **Edima H. C.**, Revol-Junelles A.-M., and Millière J.-B. (2007). "*Carnobacterium maltaromaticum*: the only *Carnobacterium* species in French ripened soft-cheeses as revealed by PCR detection. *Journal of Dairy Science* 90 (3): 1133-1138.

### 2. Communications écrites avec actes

**Edima H. C.**, Cailliez-Grimal C., Janewiski J., Revol-Junelles A.-M., Millière J.-B. « *Carnobacterium maltaromaticum*, comportement en technologie fromagère. 14ème colloque du club des bactéries lactiques ; Paris 2006.

**Edima H. C.**, Cailliez-Grimal C., Janewiski J., Revol-Junelles A.-M., Millière J.-B. « *Carnobacterium maltaromaticum*, comportement en technologie fromagère ». Sixième édition du séminaire annuel de l'école doctorale RP2E ; Nancy 2007.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification des grands groupes de bactéries lactiques .....	- 5 -
<b>Tableau 2</b> : Bactériocines synthétisées par <i>Carnobacterium</i> sp. ....	- 10 -
<b>Tableau 3</b> : Les neuf espèces du genre <i>Carnobacterium</i> , leurs habitats et les souches types .-	- 12 -
<b>Tableau 4</b> : Composés aromatiques issus du catabolisme des acides aminés par la voie des transaminases des bactéries lactiques.....	- 24 -
<b>Tableau 5</b> : Composés aromatiques identifiés dans quatre types de fromage. ....	- 25 -
<b>Tableau 6</b> : Composés aromatiques intervenant dans la flaveur des fromages .....	- 26 -
<b>Tableau 7</b> : Principales amines biogènes trouvées dans les produits alimentaires.....	- 30 -
<b>Tableau 8</b> : Antibiotiques incorporés dans les disques pour antibiogramme* .....	- 39 -
<b>Tableau 9</b> : Plan d'expériences établi selon la matrice de Doehlert .....	- 43 -
<b>Tableau 10</b> : Plan d'expériences à deux facteurs, pH initial du lait et température d'incubation, « températures chaudes » .....	- 47 -
<b>Tableau 11</b> : Plan d'expériences à deux facteurs, pH initial du lait et température d'incubation, « températures froides » .....	- 47 -
<b>Tableau 12</b> : Séquence des amorces pour des PCR avec <i>Carnobacterium</i> sp.....	- 59 -
<b>Tableau 13</b> : Les 30 fromages français à pâte molle choisis pour la recherche de <i>Carnobacterium</i> sp. ....	- 61 -
<b>Tableau 14</b> : Séquence des amorces pour l'amplification par PCR des gènes impliqués dans la production des carnobactériocines B2 et BM1 .....	- 62 -
<b>Tableau 15</b> : Comportement de cinq souches bactériennes en fonction du pH en TSA-YE, à 25 °C pendant 24 h.....	- 68 -
<b>Tableau 16</b> : Comportement de quatre souches bactériennes en fonction de concentrations en vancomycine sur milieu TSA-YE à pH 6,8 et à pH 8,8, à 25 °C pendant 24 h .....	- 69 -
<b>Tableau 17</b> : Comportement de quatre souches bactériennes en fonction de concentrations en gentamicine sur milieu TSA-YE à pH 6,8 et à pH 8,8, à 25 °C pendant 24 h .....	- 70 -
<b>Tableau 18</b> : Optimisation du milieu de numération sélective de <i>C. maltaromaticum</i> à l'aide d'un plan d'expériences. Souches tests : <i>C. maltaromaticum</i> (LMA 28, DSM 20730 <sup>T</sup> , « Réo »), <i>C. gallinarum</i> DSM 4847 <sup>T</sup> et <i>C. mobile</i> DSM 4848 <sup>T</sup> .....	- 72 -
<b>Tableau 19</b> : Optimisation du milieu de numération de <i>C. maltaromaticum</i> à l'aide d'un plan d'expériences. Souches tests : <i>E. faecalis</i> CIP 76117, <i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913, <i>D. incerta</i> CIP 104227, <i>C. viridans</i> CIP 107728.....	- 73 -
<b>Tableau 20</b> : Optimisation du milieu de numération de <i>C. maltaromaticum</i> à l'aide d'un plan d'expériences. Souches tests : <i>C. alterfunditum</i> CIP 105796, <i>C. inhibens</i> CIP 106869, <i>C. divergens</i> DSM 20623 <sup>T</sup> , <i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913, <i>E. coli</i> CIP 54.8, Flora Danica® .....	- 74 -

<b>Tableau 21</b> : Concentrations optimales en vancomycine et en gentamicine d'un milieu sélectif pour la croissance de souches appartenant aux genres <i>Carnobacterium</i> et <i>Desemzia</i> à 25 °C - 81 -	
<b>Tableau 22</b> : Validation du milieu CM pour le dénombrement de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> LMA 28..... - 82 -	
<b>Tableau 23</b> : Validation du milieu <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (CM)..... - 83 -	
<b>Tableau 24</b> : Activité antibactérienne de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 ..... - 88 -	
<b>Tableau 25</b> : Profils glucidiques de quatre souches de <i>C. maltaromaticum</i> à 30 °C pendant 48 h ... - 90 -	
<b>Tableau 26</b> : Consommation des glucides et production d'acide lactique par <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 en TSB-YE à 30 °C ..... - 94 -	
<b>Tableau 27</b> : Profils enzymatiques de six bactéries lactiques par les tests API ZYM..... - 97 -	
<b>Tableau 28</b> : Activités lipolytique et protéolytique de <i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913, <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, <i>Lc. lactis</i> DSM 20481, <i>S. thermophilus</i> INRA 302 et <i>E. faecalis</i> CIP 76117 à 30 ou à 37 °C ..... - 98 -	
<b>Tableau 29</b> : Effet de l'addition d'extrait de levure dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé sur la cinétique d'acidification de <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28, de <i>Lc. lactis</i> DSM 20481 à 30 °C et de <i>S. thermophilus</i> INRA 302 à 37 °C ..... - 103 -	
<b>Tableau 30</b> : Paramètres cinétiques obtenus à l'aide du plan d'expériences des « températures chaudes » ..... - 106 -	
<b>Tableau 31</b> : Estimation des coefficients des modèles quadratiques pour deux variables, le pH (5,20 à 8,00) et la température (23 à 37 °C) ..... - 107 -	
<b>Tableau 32</b> : Comportement de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> LMA 28 dans les fromages au cours de l'affinage..... - 137 -	
<b>Tableau 33</b> : Défauts perçus lors de la dégustation des fromages à J <sub>20</sub> par 8 juges..... - 139 -	

## Liste des figures

- Figure 1** : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par l'analyse des ARN ribosomiques 16S. .... - 13 -
- Figure 2** : Schéma général de la production de molécules aromatiques dans le fromage à partir du lactose, des triglycérides, de la caséine et du citrate ..... - 22 -
- Figure 3** : Voie de conversion des protéines pour la formation des composés aromatiques ..... - 23 -
- Figure 4** : Formation d'amines biogènes à partir d'acides aminés précurseurs : ..... - 32 -
- Figure 5** : Courbe typique de la transition sol-gel en fonction du temps montrant les différentes phases de formation du gel ..... - 35 -
- Figure 6** : Distribution des points expérimentaux dans l'espace, selon la matrice de Doehlert, . - 41 -
- Figure 7** : Réaction de dansylation des amines ..... - 55 -
- Figure 8** : Chemin optimal pour la réponse de *C. maltaromaticum* LMA 28 ..... - 78 -
- Figure 9** : Chemin optimal pour la réponse de la souche *C. maltaromaticum* « Réo » ..... - 79 -
- Figure 10** : Chemin optimal pour la réponse de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> ..... - 79 -
- Figure 11** : Chemin optimal pour la réponse de *E. faecalis* CIP 76117 ..... - 80 -
- Figure 12** : Electrophorèse des produits de la PCR réalisée avec les couples d'amorces 23SF-Cpis et Cb1-Cb2R..... - 84 -
- Figure 13** : Electrophorèse des produits de la PCR réalisée avec le couple d'amorces 23SF-Cpis et les ADN de *C. maltaromaticum* 5 et de *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub> ..... - 85 -
- Figure 14** : Electrophorèse des produits de l'amplification par PCR réalisée avec les couples d'amorces (A) Cpis-23S-7 et (B) Cdiv-23S-7 ..... - 86 -
- Figure 15** : Gel d'électrophorèse des amplifiats de séquences de gènes codant pour les bactériocines BM1 et B2..... - 88 -
- Figure 16** : Acidification du bouillon TSB-YE supplémenté ou non avec différents glucides par *C. maltaromaticum* LMA 28 préadapté au glucose (ou au lactose) à 30 °C ..... - 91 -
- Figure 17** : Hydrolyse du lactose, production d'acide lactique et excrétion du galactose par *S. thermophilus* INRA 302 en TSB-YE reconstitué avec 5 g.L<sup>-1</sup> de lactose à 37 °C ..... - 95 -
- Figure 18** : Cinétique d'acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé, supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, par quatre souches de *C. maltaromaticum*..... - 100 -
- Figure 19** : Acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la concentration en extrait de levure à 30 °C..... - 101 -
- Figure 20** : Profils d'acidification du lait UHT demi-écrémé stérilisé supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par trois souches lactiques ..... - 102 -

- Figure 21** : Acidification du lait UHT stérilisé supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la charge bactérienne initiale, à 30 °C.... - 104 -
- Figure 22** : Courbes d'isoréponses de V<sub>max</sub> et de T<sub>max</sub> de *S. thermophilus* INRA 302 en fonction du pH et de la température du lait-YE ..... - 108 -
- Figure 23** : Etude des chemins optima de V<sub>max</sub> et de T<sub>max</sub> de *S. thermophilus* INRA 302 en fonction de la température et du pH ..... - 109 -
- Figure 24** : Courbes d'isoréponses de V<sub>max</sub> et de T<sub>max</sub> de *Lc. lactis* DSM 20481 en fonction de la température et du pH..... - 110 -
- Figure 25** : Etude des chemins optima de V<sub>max</sub> et de T<sub>max</sub> de *Lc. lactis* DSM 20481 en fonction de la température et du pH..... - 110 -
- Figure 26** : Courbes d'isoréponses de V<sub>max</sub> et de T<sub>max</sub> de *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la température et du pH du lait-YE ..... - 112 -
- Figure 27** : Etude des chemins optima de V<sub>max</sub> et de T<sub>max</sub> de la température en fonction du pH - 112 -
- Figure 28** : Acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction du pH à 3, 13 et à 23 °C ..... - 114 -
- Figure 29** : Cinétiques d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en co-culture avec *Lc. lactis* DSM 20481 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure et incubé à 30 °C ..... - 116 -
- Figure 30** : Acidification du lait UHT demi-écrémé stérilisé supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par *S. thermophilus* INRA 302 ou par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30, 34,5 et 39 °C ..... - 118 -
- Figure 31** : Paramètres rhéologiques du gel produit par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C.- 120 -
- Figure 32** : Paramètres rhéologiques du gel produit par *S. thermophilus* INRA 302 à 37 °C... - 121 -
- Figure 33** : Production de composés aromatiques par *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE supplémenté avec 2 mM d'acides aminés après 16 h d'incubation à 30 °C ..... - 124 -
- Figure 34** : Production de composés aromatiques dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec 2 mM d'acides aminés par *C. maltaromaticum* LMA 28 pendant 16 h à 30 °C ..... - 126 -
- Figure 35** : Production de 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec les précurseurs du 3-méthylbutanal à 30 °C ... - 127 -
- Figure 36** : Variations du pH au cours de la croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec les précurseurs du 3-méthylbutanal à 30 °C..... - 129 -
- Figure 37** : Production de composés aromatiques dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé additionné de précurseurs du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C pendant 25 h..... - 130 -
- Figure 38** : Croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec les précurseurs du 3-méthylbutanal ..... - 131 -

- Figure 39** : Production de 3-méthylbutanal dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé par *Lc. lactis* DSM 20481 et par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C pendant 25 h ..... - 132 -
- Figure 40** : Profil chromatographique (HPLC) du laitensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 et de fromages contenant *C. maltaromaticum* LMA 28 ..... - 134 -
- Figure 41** : Suivi de *C. maltaromaticum* LMA 28 et de la flore totale mésophile dans les fromages dits "Montagnard" pendant l'affinage à 12 °C et le stockage à 4 °C. .... - 138 -

## Liste des abréviations

A : Adénine  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomique  
AFNOR : Agence Française de Normalisation  
Ala : Alanine  
AOC : Appellation d'Origine Contrôlée  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique  
ATCC : American Type Culture Collection  
ATP : Adénosine Tryphosphate  
BET : Bromure d'Ethidium  
C : Cytosine  
CDM : Chemically Defined Medium  
CIP : Collection de l'Institut Pasteur  
CM : *Carnobacterium maltaromaticum*  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
Cbn : Carnobactériocine  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse  
CTSI : Cresol Red Thallium Acetate Sucrose Inulin  
D : Dextrogyre  
Da : Dalton  
DL : mélange racémique  
DMS : Diméthylsulfure  
DMTS : Diméthyltrisulfure  
DSM : Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen  
EBRER : Bouillon à base de Ribose d' Esculine et de Rouge de phénol  
EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraAcétique  
ENITIAA : Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires  
FID : Détecteur à Ionisation de Flamme  
g : accélération de la pesanteur ( $m.s^{-2}$ )  
G : Guanine  
GRAS : General Recognized as Safe  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique  
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance  
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique  
j : jour  
L : Lévogyre  
LMA : Laboratoire de Microbiologie Alimentaire

MCM : milieu pour *Carnobacterium maltaromaticum*  
Mg<sup>2+</sup> : l'ion Magnésium  
MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de Magnésium  
min : minute  
MRS : de Man, Rogosa et Sharpe  
NaCl : Chlorure de Sodium  
NaOH : Hydroxyde de Sodium  
ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside  
pb : paire de bases  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
p/v : poids par volume  
qsp : quantité suffisante pour  
T : Tyramine  
TBE : Tris Borate EDTA  
TE : Tris EDTA  
TS : Tryptone-Sel  
TSB : Trypcase Soya  
TSA-YE : Trypcase Soya Agar-Yeast Extract  
TSB-YE : Trypcase Soya Broth-Yeast extract  
Ufc : unité formant colonies  
UHT : ultra higher temperature  
UV : Ultra violet  
v/v : volume par volume  
Y E: yeast-extract (extrait de levure)

**Les genres bactériens**

*B.* : *Brochothrix*  
*Br.* : *Brevibacterium*  
*C.* : *Carnobacterium*  
*D.* : *Desemzia*  
*E.* : *Enterococcus*  
*E.* : *Escherichia*  
*G.* : *Geotrichum*  
*L.* : *Listeria*  
*Lb.* : *Lactobacillus*  
*Lc.* : *Lactococcus*  
*P.* : *Penicillium*  
*Ps.* : *Pseudomonas*  
*S.* : *Streptococcus*  
*S.* : *Staphylococcus*

Sp : genre

Spp : espèce

Ssp : sous-espèce

## **Introduction**



## Introduction

Les thèmes de recherche de l'équipe de microbiologie alimentaire du LSGA portent sur l'identification phénotypique et génotypique et sur la caractérisation de propriétés culturales de souches bactériennes utiles, comme les bactéries lactiques et de flores d'altération ou pathogènes. Le comportement de ces flores, dans différents modèles alimentaires, est analysé à l'aide de plans d'expériences mettant en jeu différents paramètres physico-chimiques. En 1990, un grand groupe industriel fabriquant des fromages à pâte molle au lait cru avait proposé une étude sur la flore lactique banale du lait de fabrication. L'objectif était de tenter de démontrer que la spécificité et la particularité de certains fromages d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) étaient en relation avec cette flore. La notion de terroir était un formidable atout publicitaire. A cette époque les fromages au lait cru étaient fortement attaqués par les pays de l'Europe du nord qui ne proposaient que des fromages fabriqués à partir de lait thermisé ou de lait pasteurisé n'offrant pas de ce fait toute la diversité gustative souhaitée. Des fromages avaient été prélevés à différentes périodes de l'année en relation notamment avec la mise à l'herbe, au printemps. Les analyses microbiologiques, numération et identification de la flore lactique, avaient permis d'isoler et de purifier des souches qui devaient être utilisées en tant que levain « de terroir » après détermination de leurs aptitudes fromagères. Lors de cette étude, des souches non conventionnelles ont été isolées (Millière *et al.*, 1994 ; Millière et Lefebvre 1994).

Cependant, à l'aide de tests phénotypiques, ce groupe de bactéries atypiques isolées de six fromages ne pouvait être identifié jusqu'à l'espèce. Trente six isolats, classés dans le genre *Lactobacillus*, ne correspondaient à aucune des espèces du groupe II, caractérisés par une hétérofermentation facultative, souvent l'absence de production de CO<sub>2</sub> et une température optimale de croissance proche de 30 °C. Ces souches avaient été provisoirement classées comme des lactobacilles atypiques dont certains caractères les différenciaient de l'espèce *Lb. casei* et surtout de *Lb. plantarum*. Produisant de l'acide lactique L (+), elles étaient également psychrotrophes, aptitude très rare de se multiplier en régime de réfrigération.

Parallèlement à ce contrat avec ce groupe fromager, le thème dominant du laboratoire était la recherche de bactéries lactiques productrices de bactériocines. Ainsi, les trente six isolats ont été criblés en vue de la recherche de la production de ces peptides biocides. Un certain

nombre d'isolats possédaient un spectre d'activité relativement large, notamment par l'inhibition de la croissance de certains isolats de ce groupe, non producteurs de bactériocines, mais également par une action anti-*Listeria monocytogenes*. Ainsi l'optimisation de la production des bactériocines a-t-elle été entreprise sur la souche LMA 5. La difficulté de cette étude résidait sur son identification au genre *Lactobacillus* acidophile, non psychrotrophe et pouvant se développer sur le milieu de Rogosa (pH 5,6), alors que cette souche possédait des caractères contraires. Une recherche bibliographique avait également permis d'observer que des lactobacilles atypiques avaient été classés dans le groupe III (hétérofermentaire), relativement hétérogène. Des souches types de collection de *Carnobacterium* sp. avaient alors été commandées, *C. piscicola*, *C. divergens*, *C. mobile*, *C. gallinarum*, afin de procéder à l'identification génotypique de ces trente six isolats. Ces tests d'hybridation avaient finalement permis de les identifier au genre *Carnobacterium* dont les espèces étaient préalablement classées dans le genre *Lactobacillus*. Ce nouveau genre avait été proposé par Collins *et al.* (1987) suite à une étude taxonomique. La majorité des trente six isolats appartenait à l'espèce *C. piscicola*.

En 1974, la présence de *Carnobacterium* sp. dans le lait était déjà mentionnée par Miller *et al.* en tant que *Lb. maltaromaticus*, donnant une saveur maltée. Puisque les fromages AOC contenaient cette espèce, quelquefois en quantité importante, une étude a été réalisée en 1994, par Millière et Lefebvre, sur des fromages français à pâte molle, afin de rechercher sa présence. Un milieu électif a été ainsi mis au point, le milieu EBRER, dont la principale caractéristique était la fermentation du ribose en psychrotrophie ( $7,0 \pm 0,5$  °C-10 jours) de l'esculine et du citrate de fer. Cette « cartographie » d'un échantillonnage relativement important a ainsi montré que cette flore lactique psychrotrophe était relativement fréquente. La présence massive de cette flore opportuniste dans les fromages AOC en fin d'affinage, après stockage prolongé au froid, n'était pas responsable d'altération significative. Cette flore bactérienne avait du être rapidement « identifiée » dans le passé à des lactobacilles atypiques. Tout l'intérêt était de savoir comment cette flore non conventionnelle pouvait se comporter lors des différentes étapes de la fabrication fromagère et si sa présence éventuellement importante pouvait modifier favorablement la texture et la saveur des fromages à pâte molle après un affinage prolongé.

Un autre groupe fromager, le groupe Bongrain-Gérard S.A.S, voulait également donner, à des fromages réalisés au lait thermisé, une note plus rustique ou de terroir. Ainsi,

différentes souches de la collection du LSGA, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconoctoc* et *Carnobacterium* ont été testées dans des fabrications de fromages de très petits formats (25 g). Seul le genre *Carnobacterium* a été retenu, car il donnait quelquefois des fromages meilleurs que le fromage commercialisé. Parmi les souches de *Carnobacterium* sp., la souche *C. piscicola* LMA 28 a été retenue pour une étude plus approfondie. Les essais de criblage avaient également montré qu'elle produisait un ou plusieurs peptides biocides.

Cette flore lactique non conventionnelle, connue dans les filières viande et poisson, n'est pas utilisée comme levain lactique en industrie fromagère. Elle possède pourtant des propriétés inhabituelles aux bactéries lactiques et potentiellement intéressantes sur le plan technologique comme son aptitude à se multiplier à basse température, la production de bactériocines anti-*Listeria monocytogenes* et sa capacité à produire des arômes à odeurs maltée ou chocolatée dans des conditions non maîtrisées.

La France est le deuxième pays consommateur du fromage dans le monde avec 24,5 kg de fromage par habitant et par an. En 2005, l'élevage laitier a produit vingt quatre millions de tonnes de lait afin de fabriquer un million huit cent mille tonnes de fromages, dont 27 % à pâte molle. Les ferments lactiques présentent donc un intérêt économique important dans un marché saturé par une grande diversité de produits laitiers et soucieux de créer des produits innovants. La fabrication de fromages au goût original agrandira leur gamme et pourra satisfaire les consommateurs adeptes de nouveaux produits.

Cette nouvelle flore bactérienne atypique peut jouer un rôle important lors d'un affinage prolongé des fromages à pâte molle, en raison de son aptitude à se développer rapidement à des valeurs de pH fortement basiques (9,0). L'étude de ses propriétés métaboliques et de son comportement dans les produits laitiers permettra de la proposer comme levain d'affinage en vue de fabrications de nouvelles spécialités fromagères.

Après une revue bibliographique sur les bactéries lactiques, le genre *Carnobacterium*, les méthodes d'identification et l'incidence des bactéries lactiques atypiques dans les fromages, nous aborderons la méthodologie qui permettra d'utiliser et/ou de mettre au point des méthodes d'identification phénotypique et génotypique, pour la numération de souches de *C. maltaromaticum*, afin de suivre son comportement lors des différentes

phases de la fabrication des fromages. Dans une deuxième partie, nous étudierons la physiologie de *C. maltaromaticum* en bouillon de laboratoire et dans du lait, en fonction de différents paramètres technologiques (température, pH, niveau d'inoculation...) afin d'étudier son métabolisme fermentaire, par comparaison avec d'autres bactéries lactiques traditionnelles. Dans une dernière partie nous évaluerons l'aptitude fromagère de *C. maltaromaticum* par la fabrication de fromages à pâte molle ainsi que l'intérêt de son utilisation en technologie fromagère par la production de composés volatils à arôme malté et de bactériocines ; « l'alimentarité » des fromages sera testée par la recherche d'amines biogènes. Ces travaux de recherche devraient permettre de classer *C. maltaromaticum* comme auxiliaire technologique d'affinage avec le statut « GRAS ».

## **Chapitre I : Revue bibliographique**



## I.1. LES BACTERIES LACTIQUES

### I.1.1. Connaissances générales

Les bactéries lactiques constituent un groupe de micro-organismes, assez hétérogènes sur les plans physiologique et morphologique, qui ont la particularité de produire, des quantités importantes d'acide lactique à partir de l'hydrolyse du lactose et de la fermentation du glucose et/ou du galactose. Ce sont des cellules à Gram-positif, ayant la forme de coque, de bacille ou de coccobacille. Les cellules sont généralement immobiles, asporulées et micro-aérophiles. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles, en acides gras, en acides aminés, en peptides, en vitamines et en sels. Leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance (Tableau 1).

**Tableau 1:** Classification des grands groupes de bactéries lactiques (Stiles et Holzapfel 1997)

Genres <sup>a</sup>	Forme	Catalase	Nitrate réductase	Fermentation	Genres bactériens
<i>Betabacterium</i>	bacille	-	-	hétérofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	bacille	-	-	homofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	bacille	-	-	homofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	coque	-	-	homofermentaire	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	coque	-	-	hétérofermentaire	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Tetracoccus</i>	coque	+ <sup>b</sup>	+	homofermentaire	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

(<sup>a</sup>) : classification d'Orla-Jensen, 1919 ; (<sup>b</sup>) : le genre *Pediococcus* est généralement catalase négative mais certaines espèces produisent des pseudocatalases

Les bactéries lactiques sont associées aux plantes (chou, maïs, orge, mâche, chou frisé), aux ensilages, aux produits carnés et aux produits laitiers. Elles sont également utilisées dans la transformation de viandes et la production de boissons alcooliques et de légumes fermentés (Carr *et al.*, 2002). Ces aliments incluent les saucisses, les jambons, les vins, les bières et les conserves de légumes acidifiés. En technologie laitière, la principale caractéristique de ces bactéries est leur capacité à coaguler le lait, par production de quantités importantes d'acide lactique.

### **I.1.2. Intérêts des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques produisent des métabolites qui améliorent la conservation des produits alimentaires (Caplice et Fitzgerald 1999). Les acides organiques, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. En diffusant à travers les couches lipidiques de la membrane bactérienne, ils provoquent un abaissement du pH interne par libération de protons, déstabilisant ainsi le fonctionnement de la cellule bactérienne (Booth, 1985). Le peroxyde d'hydrogène, produit en présence d'oxygène, s'accumule en l'absence de catalase ; son pouvoir oxydatif provoque l'oxydation des lipides et la libération des acides nucléiques (Block, 1991). Le dioxyde de carbone, formé au cours de la fermentation hétérolactique, crée un environnement anaérobie qui s'avère toxique pour certains micro-organismes aérobies (Eklund 1984). Certaines souches de bactéries lactiques produisent des bactériocines à spectre d'action plus ou moins large comme la nisine et la lactostrepcine produites par *Lc. lactis*, la diplosine par *Lc. cremoris*, la plantaricine par *Lb. plantarum*, la mesentéroïne et la leucocine produites par *Ln. mesenteroides* (Piard et Desmazeaud 1992 ; Piard *et al.*, 1992 ; Vandenberg 1993 ; Corbier *et al.*, 2001). La production de ces peptides biocides peut présenter un intérêt dans la lutte contre des bactéries à Gram-positif d'altération ou pathogènes.

Bien qu'apportant des effets bénéfiques dans l'industrie alimentaire, les bactéries lactiques peuvent aussi être des flores de contamination par la production de saveurs désagréables et de produits toxiques, comme les amines biogènes. Certaines espèces bactériennes, isolées chez des patients présentant des systèmes immunitaires altérés,

sont des agents étiologiques de l'endocardite et à l'origine de septicémie (Aquirre et Collins 1993). La coopération entre les industries médicales et alimentaires est nécessaire afin de mettre au point des traitements appropriés (Carr *et al.*, 2002). Des études ont suggéré l'emploi de certaines bactéries lactiques en médecine préventive en tant que probiotiques ; elles permettraient ainsi de créer une nouvelle flore intestinale, capable de concurrencer des flores potentiellement nocives, en les empêchant de coloniser les parois du tube digestif (Fernandez *et al.*, 1987 ; Daeschel 1989).

### **I.1.3. Le genre *Carnobacterium***

#### **I.1.3.1. Systématique bactérienne**

Le genre *Carnobacterium* a été proposé en 1987 par Collins *et al.* pour classer les espèces *Lactobacillus carnis*, *Lb. divergens* et *Lb. piscicola*, ainsi que des souches, ressemblant à des *Lactobacillus*, qui furent isolées de viande. En utilisant l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S, Wallbanks *et al.* (1990) ont montré que ces espèces possédaient un haut degré de similitude (96-98 %) ; elles formaient un groupe phylogénétiquement distinct des autres bactéries lactiques. Ce nouveau genre regroupait les espèces *C. piscicola*, *C. divergens*, *C. gallinarum* et *C. mobile*. Deux nouvelles espèces, *C. funditum* et *C. alterfunditum* ont ensuite été isolées de lacs d'eau douce de l'Antarctique (Franzmann *et al.*, 1991). Des carnobactéries ont été mises en évidence dans des fromages à pâte molle et à croûte fleurie où elles constituaient l'une des flores lactiques dominantes en fin d'affinage (Millière *et al.*, 1994 ; Millière et Lefebvre 1994). En 1999, sur la base de la séquence des ARNr 16S et des caractères phénotypiques, Jobörn *et al.* proposent une nouvelle espèce, *C. inhibens*, pour classer une souche isolée du tube digestif d'un saumon de l'Antarctique ; une autre espèce, *C. viridans*, a été proposée en 2002 par Holley *et al.* pour trois souches isolées d'une sauce bolognaise conditionnée sous vide. En 2003, Mora *et al.* montrent que *C. piscicola* et *Lb. maltaromaticus* sont des synonymes hétérotypiques. L'épithète spécifique *maltaromaticus* ayant priorité sur celle de *piscicola*, pour des raisons d'antériorité, les auteurs valident pour ce taxon la nomenclature *C. maltaromaticum*. Actuellement le

genre *Carnobacterium* regroupe neuf espèces, *C. alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. inhibens*, *C. maltaromaticum*, *C. mobile*, *C. pleistocenium* et *C. viridans*.

### **I.1.3.2. Caractères physiologiques**

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram-positif, se présentant de manière isolée ou groupée par deux (formant un V caractéristique) ou parfois en courte chaîne, non sporulés, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies, catalase négative, à métabolisme fermentatif par production d'acide lactique L(+); ces bactéries sont incapables de croître en présence de 8 % de NaCl et à 45 °C, mais donnent des colonies visibles à 10 °C et parfois à 0 °C. A l'aide de tests thermolytiques, il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. Toutefois, les *Carnobacterium* sp. ne se développent pas sur le milieu à l'acétate de Rogosa (pH 5,6), sont capables de se développer à des pH plus alcalins que *Lactobacillus* sp. (croissance possible jusqu'à pH 9,5); certaines espèces sont mobiles (*C. funditum*, *C. inhibens* et *C. mobile*); leur principal acide gras membranaire est l'acide oléique et leur peptidoglycane est du type A1 gamma (Schleifer *et al.*, 1968). Leur contenu en Guanine et Cytosine (G+C) est compris entre 33 et 37 pour 100 moles d'ADN (Collins *et al.*, 1987).

*Carnobacterium viridans* est responsable du verdissement, observé après ouverture de sauces bolognaises emballées sous vide. Ce verdissement résulte de la production bactérienne d'eau oxygénée et de l'exposition à l'oxygène de l'air qui provoquent une oxydation de la myoglobine (avec formation de cholémyoglobine) et de porphyrines (Holley *et al.*, 2002).

### **I.1.3.3. Production de bactériocines**

Une bactériocine est un peptide provenant de la synthèse ribosomique bactérienne, subissant ou non des modifications post-traductionnelles, qui est excrété dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action bactéricide relativement étroit comprend quelques souches appartenant à la même espèce que la souche productrice; celle-ci possède un

moyen de protection spécifique vis-à-vis de sa propre bactériocine, par production des protéines d'immunité.

Certaines souches du genre *Carnobacterium* peuvent produire des bactériocines actives sur d'autres bactéries lactiques et/ou sur d'autres espèces bactériennes (Tableau 2). C'est le cas notamment de *C. maltaromaticum* LV17 NCBF 2855 qui excrète trois bactériocines, la carnobactériocine A (codée par le plasmide pCP49), la carnobactériocine BM1 (codée par le chromosome) et la carnobactériocine B2 (codée par le plasmide pCP40) (Quadri *et al.*, 1994). L'action de ces carnobactériocines s'exerce sur de nombreuses bactéries à Gram-positif et notamment sur des souches de *Listeria* sp. et d'*Enterococcus* sp. De manière similaire, la piscicoline, produite par *C. maltaromaticum* JG126, la carnocine CP5, produite par *C. maltaromaticum* CP5 (Mathieu *et al.*, 1993), une bactériocine produite par *C. maltaromaticum* LK5 (Buchanan et Klawitter 1991), la divergicine M35 produite par *C. divergens* M35 (Tahiri *et al.*, 2004) et la divercine V41 produite par *C. divergens* V41 (Richard *et al.*, 2003, Richard *et al.*, 2004) inhibent la croissance de *L. monocytogenes*.

De nombreuses études ont porté sur l'inhibition de *L. monocytogenes* par diverses carnobactériocines isolées de différents produits frais. Cette problématique représente un réel intérêt dans l'amélioration de la conservation des aliments (Duffes *et al.*, 1999 ; Schobitz *et al.*, 2003 ; Yamazaki *et al.*, 2003 ; Brillet *et al.*, 2004 ; Nilsson *et al.*, 2004 ; Yamazaki *et al.*, 2005 ; Brillet *et al.*, 2005).

En plus des gènes de biosynthèse des bactériocines, des gènes d'immunité sont présents (Quadri *et al.*, 1997). Situés sur le même locus génétique, ils sont coexprimés avec les gènes de biosynthèse et codent pour une ou des protéines, conférant ainsi à la bactérie une résistance à sa bactériocine. En 2004, Sprules *et al.* ont démontré que l'immunité contre la carnobactériocine B2 (CbnB2) était due à l'interaction entre CbnB2 et ImB2 avec un récepteur membranaire et ces auteurs ont rejeté la possibilité d'une interaction entre CbnB2 et ImB2. La connaissance du fonctionnement du locus génétique se révèle donc comme un atout très important dans la maîtrise de la biosynthèse des carnobactériocines. La synthèse de la carnocine KZ213, produite par *C. piscicola* KZ213, serait régulée par la température, le pH et la composition du milieu (Khouiti et Simon 2004).

Tableau 2 : Bacteriocines synthétisées par *Carnobacterium* sp.

Bactériocines	Souches productrices	Séquence primaire	Spectres d'activité	Références
Carnocine UI49	<i>C. maltaromaticum</i> UI49	Nterm-GSEIQPR <sup>a</sup>	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Lactococcus</i> sp.	Stoffels <i>et al.</i> , 1992a, Stoffels <i>et al.</i> , 1992c ; Stoffels <i>et al.</i> , 1992b
Carnobactériocine BM1 ou pisciocine V1b	<i>C. maltaromaticum</i> LV17B	AISYNGVYCNKEKCWVNKAENKQA ITGIVIGGWASSLAGMGH	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Listeria</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Carnobacterium</i> sp.	Quadri <i>et al.</i> , 1994
Carnobactériocine B2 ou carnocine CP52	<i>C. maltaromaticum</i> LV17B	VNYGNGVSCSKTKCSVNWGQAFQER YTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	<i>Listeria</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.	Herbin <i>et al.</i> , 1997, Quadri <i>et al.</i> , 1994
Carnobactériocine A ou piscicoline 61	<i>C. maltaromaticum</i> LV17A	DQMSDGVNYGKGSLSKGGAKCGLG IVGGLATIPSGPLGWLAGAAGVINSC MK	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	Franz <i>et al.</i> , 2000, Worobo <i>et al.</i> , 1994 Holck <i>et al.</i> , 1994, Schillinger <i>et al.</i> , 1993
Divergicine 750	<i>C. divergens</i> 750	KGILGKLGVVQAGVDFVSGVWAGIK QSAKDHPNA	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. <i>Listeria</i> sp.	Holck <i>et al.</i> , 1996
Pisciocine V1a ou piscicoline 126	<i>C. maltaromaticum</i> V1	KYYGNGVSCNKGCTVDWSKAIGIIG NNAAANLTTGGAAGWNKG	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Listeria</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp.	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996, Jack <i>et al.</i> , 1996
Carnocine KZ213	<i>C. maltaromaticum</i> KZ213	Inconnu	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Listeria</i> sp.	Khouiti et Simon 1997, Khouiti et Simon 2004
Divercine V41	<i>C. divergens</i> V41	TKYYGNGVYCNKCKWVDWQASG CIGQTVVGGWLGGAIPGKC	<i>Listeria</i> sp.	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1999

Carnocine H	<i>Carnobacterium</i> sp 377	Nterm- X-N-KKKKKKVVCF(S)SC <sup>b</sup>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Listeria</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Carnobacterium</i> sp.	Blom <i>et al.</i> , 2001
Divergicine M35	<i>C. divergens</i> M35	TKYYGNGVYCNSKCCWVDWGTAQG CIDVVIGQLGGGIPGKGC	<i>Lactococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Listeria</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp.	Tahiri <i>et al.</i> , 2004
Piscicocine CS526	<i>C. maltaromaticum</i> CS526	KYYGNGLSXNKKGXTVDWGTAIGIIG NNAAANXATGGAAGXNK	<i>Listeria</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp.	Yamazaki <i>et al.</i> , 2005
Divergicine A	<i>C. divergens</i> LV13	AAPKITQKQKNCVNGQLGGMLAGAL GGPGGVVLGGIGGAIA GGCFN	<i>Carnobacterium</i> sp. <i>Lactococcus</i> sp.	van Belkum et Stiles 2006, Worobo <i>et al.</i> , 1995

(a): la séquence des sept premiers résidus d'acides aminés est N-Gly-Ser-Glu-Ile-Gln-Pro-Arg ; (b): la carnocine H comprend 75 résidus d'acides aminés

### I.1.3.4. Habitats du genre *Carnobacterium*

Les représentants du genre *Carnobacterium* ont des habitats divers (Tableau 3) ; ils ont été isolés de viande (bœuf, porc, mouton) réfrigérée et/ou emballée sous vide (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *C. viridans*) (Montel *et al.*, 1991 ; Stoffels *et al.*, 1992b), de viande de volaille (*C. divergens*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. maltaromaticum*), de lait possédant une odeur de malt (*Lb. maltaromaticum*) (Miller III *et al.*, 1974), de fromages affinés (*C. divergens* et *C. piscicola*) (Millière *et al.*, 1994), d'eau douce de lacs de l'Antarctique (*C. alterfunditum* et *C. funditum* ; Franzmann *et al.*, 1991) et de poissons (*C. inhibens* et *C. maltaromaticum*) (Hiu *et al.*, 1984 ; Baya *et al.*, 1991 ; Stoffels *et al.*, 1992b ; Leroi *et al.*, 1998).

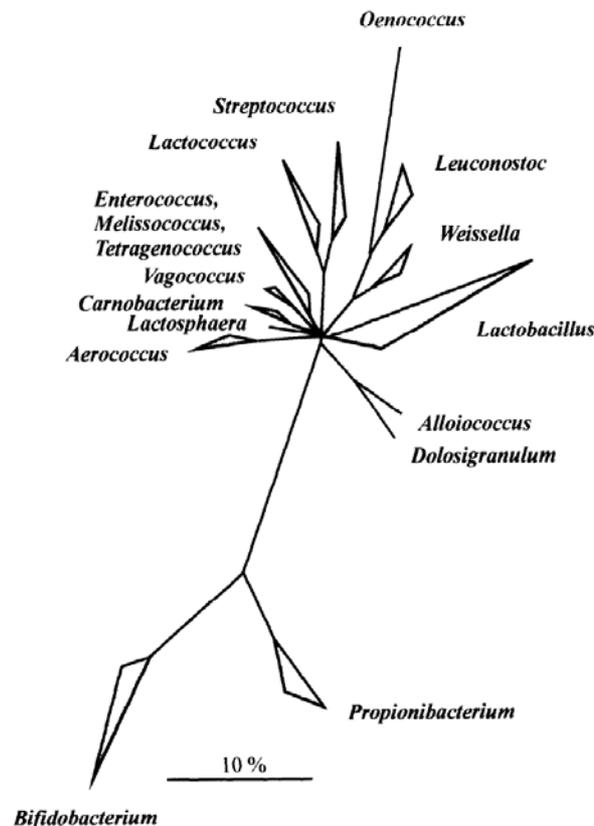
**Tableau 3** : Les neuf espèces du genre *Carnobacterium*, leurs habitats et les souches types (synthèse des documents fournis par des collections publiques de souches)

<b>Nouvelle nomenclature</b>	<b>Code des souches types</b>	<b>Ancienne nomenclature</b>	<b>Habitats</b>
<i>C. divergens</i>	ATCC 35677 <sup>T</sup> DSM 2062 <sup>T</sup>	<i>Lb. divergens</i>	Viande réfrigérée ou emballée sous-vide, volaille et surface de fromage affiné au lait cru
<i>C. maltaromaticum</i>	ATCC 35586 <sup>T</sup> DSM 20730 <sup>T</sup>	<i>Lb. piscicola</i> <i>Lb. carnis</i>	Viande réfrigérée ou emballée sous-vide, volaille, poisson et surface de fromage affiné au lait cru, lait présentant une odeur de malt
<i>C. gallinarum</i>	DSM 4847 <sup>T</sup>		Carcasse de poulet
<i>C. mobile</i>	DSM 4848 <sup>T</sup>		Viande de poulet irradiée
<i>C. funditum</i>	ATCC 49836 <sup>T</sup> DSM 5970 <sup>T</sup>		Lac glacé de l'Antarctique, eau douce et pauvre en oxygène
<i>C. alterfunditum</i>	ATCC 49837 <sup>T</sup> DSM 5972 <sup>T</sup>		Lac glacé de l'Antarctique, eau douce et pauvre en oxygène
<i>C. inhibens</i>	CIP 106863 <sup>T</sup> DSM 13024 <sup>T</sup>		Tube gastro-intestinal de saumons de l'Atlantique
<i>C. viridans</i>	DSM 14451 <sup>T</sup> ATCC BAA 336 <sup>T</sup>		Viande réfrigérée ou emballée sous-vide, sauce bolognaise emballée sous vide
<i>C. pleistocenium</i>	DSM 17715 <sup>T</sup> ATCC BAA 754 <sup>T</sup> CIP 108033 <sup>T</sup>		Noyau de glace de l'étang pléistocène de thermokarst

(ATCC) : American Type Culture Collection ; (DSM) : Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen ; (CIP) : Collection de l'Institut Pasteur.

### I.1.3.5. Position taxonomique

L'étude du genre *Carnobacterium*, par l'analyse des séquences de l'ARN ribosomique 16S (Wallbanks *et al.*, 1990), confirme la similarité entre les espèces et leurs différences vis-à-vis des autres bactéries lactiques. Bien que les carnobactéries aient été associées initialement aux lactobacilles, le genre *Carnobacterium* est cependant plus proche phylogénétiquement des genres *Enterococcus* et *Vagococcus* (Figure 1). De plus, les entérocoques et les carnobactéries possèdent des caractères physiologiques qui ne se retrouvent pas chez les lactobacilles comme la possibilité de croître à des valeurs élevées de pH (jusqu'à 9,5), de résister à certains antibiotiques et leur exigence en vitamines. Le genre *Desemzia* possède une morphologie et un métabolisme semblable à ceux des carnobactéries ainsi que la composition en bases (C + G) et en acides gras membranaires. Cependant, il contient une grande quantité d'acide vaccénique tandis que le principal acide gras membranaire des carnobactéries est l'acide oléique (Stackebrandt *et al.*, 1999).



**Figure 1** : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par l'analyse des ARN ribosomiques 16S (Stiles et Holzapfel 1997).

## **I.2. METHODES D'IDENTIFICATION DE *CARNOBACTERIUM* SP.**

L'identification des micro-organismes est une nécessité dans les industries alimentaires. Elle permet de détecter des souches d'altération ou des souches pathogènes mais également de suivre des flores d'intérêt lors des différentes étapes de la fabrication d'un produit. Cette identification reposait à l'origine uniquement sur l'observation microscopique des cellules et sur un certain nombre de caractères physiologiques, comme l'assimilation des sucres, l'halotolérance, l'acidotolérance et les températures cardinales de croissance. Ces connaissances ont permis de mettre au point de nombreux milieux de culture, électifs ou sélectifs, pour la numération d'une flore donnée au sein d'une communauté microbienne complexe. Cette approche phénotypique a été complétée par une approche génotypique suite au développement de nombreuses techniques de biologie moléculaire fondées sur tout ou partie du génome microbien. Ainsi des hybridations ADN-ADN de séquences conservées de l'ARNr 16S ou de l'ARN 23S ou de régions intergéniques 16S-23S ont-elles profondément bouleversé les classifications précédemment établies.

### **I.2.1. Identification génotypique du genre *Carnobacterium***

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour caractériser des populations de bactéries lactiques associées à la viande (Yost et Natress, 2000). Une amorce spécifique des genres *Carnobacterium* et *Leuconostoc* a été créée à partir d'une sonde oligonucléotidique de l'ARN 16S et utilisée dans une PCR multiplex en combinaison avec des amorces spécifiques aux espèces *Lb. curvatus* et *Lb. sake*. En 2002, Scarpellini *et al.* ont utilisé la technique de PCR pour l'identification genre-spécifique et espèce-spécifique des souches de *Carnobacterium*. L'espace intergénique 16S-23S de souches de carnobactéries a été comparé avec celui de souches de bactéries lactiques phylogéniquement proches. La PCR, fondée sur le polymorphisme de la région intergénique 16S-23S de l'ADN ribosomique, a également permis la différenciation des espèces du genre *Carnobacterium* (Kabadjova *et al.*, 2002) et celle de *C. piscicola* et de *C. divergens* des genres *Lactococcus* et *Enterococcus*, isolés de produit commerciaux (Barakat *et al.*, 2000). Cette méthode a été complétée par

Rachman *et al.* (2004) par la mise au point de huit amorces spécifiques à chaque espèce du genre *Carnobacterium* (*C. piscicola*, *C. divergens*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum*, *C. alterfunditum*, *C. inhibens* et *C. viridans*). Les conditions spécifiques pour l'identification par PCR de souches de *Carnobacterium* sp. dans les fromages ont été déterminées par Cailliez-Grimal *et al.* (2005).

### **I.2.2. Identification phénotypique du genre *Carnobacterium***

Des bactéries lactiques atypiques, proches du genre *Lactobacillus*, peuvent être isolées de fromages en utilisant la gélose sélective de Rogosa (Rogosa *et al.*, 1951). En se fondant sur les conditions d'incubation, en psychrotrophie, et non sur des valeurs élevées de pH, le milieu EBRER a été mis au point (Millière et Lefebvre 1994). Ce milieu contient par litre : 7 g de Bio-trypcase, 3 g d'extrait de levure, 1 g de Tween 80, 5 g de NaCl, 1 g d'esculine, 0,5 g de citrate de fer III, 0,04 g de rouge de phénol, 15 g d'agar, 10 g de D-ribose, 5 mg d'amphotéricine et 40 mg d'acide nalidixique. Sur ce milieu gélosé coloré en rouge, légèrement opaque, les colonies de *Carnobacterium* sp. apparaissent en noir (hydrolyse de l'esculine) entourées d'une zone d'acidification jaune, suite à la fermentation du ribose. L'amphotéricine et l'acide nalidixique empêchent respectivement la croissance de la flore fongique et des bactéries Gram-négatives. Ce milieu n'est pas suffisamment sélectif vis-à-vis des différents genres Gram-positifs. Par ailleurs, le temps d'incubation de 10 jours à 7 °C est trop long pour le suivi de *Carnobacterium* sp. dans une matrice alimentaire complexe comme le fromage.

En se fondant sur les propriétés physiologiques des souches appartenant au genre *Carnobacterium*, un milieu de culture sélectif, le milieu CTSI (Cresol Red Thallium Acetate Sucrose Inulin) a été mis au point par Wasney *et al.* (2001). Ce milieu a été utilisé au laboratoire et n'a pas donné entière satisfaction, en raison de son trop fort pouvoir inhibiteur vis-à-vis des isolats de ce genre bactérien (Klandar, 2004).

Il s'est donc avéré nécessaire d'élaborer un autre milieu de numération sélectif, mais moins inhibiteur que le milieu CTSI, fondé sur les propriétés inhibitrices de certains

antibiotiques, de valeurs alcalines de pH associées à un barème d'incubation approprié. De plus le milieu CTSI très coloré ne permet pas une lecture automatisée du nombre de colonies.

### **I.2.2.1. Intérêt des différents constituants du milieu de culture**

#### **\* Vancomycine**

Ce glycopeptide de faible poids moléculaire (1450 Da) est instable en solution alcaline (pH 9). La vancomycine n'est active que vis-à-vis des bactéries à Gram-positif. Cet antibiotique traverse la paroi bactérienne et se fixe spécifiquement sur le dipeptide D-Ala-D-Ala, unité de base et précurseur de la synthèse du peptidoglycane. Cette fixation, par l'encombrement stérique qu'elle provoque, bloque deux des principales voies enzymatiques nécessaires à la synthèse du peptidoglycane, la transglycosylation et la transpeptidation, entraînant ainsi l'inhibition de la croissance, puis la mort cellulaire (Bryskier, 1999).

La vancomycine est active à des concentrations inférieures à 4 mg.L<sup>-1</sup> vis-à-vis de *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *E. faecalis* et *E. faecium*, *L. monocytogenes* et des genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Propionibacterium*. Elle est sans action vis-à-vis de *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Nocardia* sp. Des espèces du genre *Leuconostoc*, genre résistant à la vancomycine, sont quelquefois présentes dans des levains commerciaux (Flora Danica<sup>®</sup>), mais sont incapables de pousser à pH 8,5 (Bryskier, 1999).

#### **\* Gentamicine**

C'est un aminoglycoside de faible poids moléculaire (500 à 800 Daltons) utilisé à l'état de sulfate. Stable en solution à pH neutre et thermostable, il est sensible aux variations de pH et son activité est optimale entre pH 7,5 et 8,5. Son mode d'action est bactéricide, vis-à-vis des bacilles aérobies à Gram-négatif comme *Pseudomonas fluorescens*, mais également vis-à-vis d'espèces Gram-positives (*L. monocytogenes*, *Corynebacterium* sp., *Bacillus anthracis* et *Staphylococcus* sp.). En revanche, il est peu ou pas actif sur les bactéries anaérobies strictes, comme les entérocoques et les pneumocoques. La gentamicine agit essentiellement au niveau du ribosome bactérien en

perturbant la lecture du code génétique et en inhibant toutes les étapes de la synthèse protéique (Bryskier, 1999).

### \* L'acide nalidixique

Ce fluoroquinolone du groupe IA (dérivés monocycliques) est une molécule amphotère, peu sensible à l'action du pH et chargée négativement à pH alcalin. Il inhibe la croissance des bactéries à Gram-négatif, notamment les entérobactéries, en agissant essentiellement sur l'ADN gyrase et sur la topoisomérase IV (Bryskier, 1999).

## I.3. LE FROMAGE ET LES BACTERIES LACTIQUES

### I.3.1. Le fromage

Le fromage est un mode de conservation des deux principaux constituants insolubles du lait, la caséine et la matière grasse, et d'une partie plus ou moins importante des sels minéraux et des éléments solubles (De Roissart, 1986). Sa fabrication, selon les méthodes traditionnelles, comprend trois étapes successives :

- **coagulation du lait** : sous l'effet d'une acidification par la fermentation lactique et/ou par l'addition d'un agent coagulant enzymatique (présure), le lait se transforme en gel. Bien qu'issus de mécanismes très différents, les deux procédés de coagulation (par acidification ou par voie enzymatique) aboutissent à la formation d'un coagulum résultant d'une modification irréversible de la structure des caséines du lait. Ces caséines, associées à des minéraux, forment un réseau tridimensionnel, spécifique du mode de coagulation appliqué, donnant soit un gel « lactique », soit un gel « présure » qui emprisonne dans ses mailles des globules gras, des bactéries et du lactosérum.

- **Egouttage du gel** : selon le mode de coagulation du lait et les conditions ambiantes, le gel expulse plus ou moins rapidement et fortement le lactosérum lors de l'égouttage. Cette synérèse peut être considérée comme la continuation de l'organisation du gel par la mise en place de liaisons caséines-sels minéraux. L'acidification par les bactéries

lactiques, en solubilisant une partie des minéraux liés aux caséines, diminue la quantité d'eau liée aux protéines et permet ainsi la poursuite de l'égouttage, jusqu'à la fin du salage. L'expulsion du lactosérum hors du gel est favorisée par des facteurs mécaniques (le découpage du caillé augmente les surfaces d'exsudation et le brassage entretient ces surfaces), des facteurs physiques (le chauffage permet l'établissement de nouvelles liaisons au sein du gel) et des facteurs chimiques (l'acidification accroît la perméabilité du gel et diminue la couche d'eau liée aux caséines). Selon l'intensité de ces facteurs, les teneurs en eau et en calcium des caillés seront très différentes et conditionneront en grande partie l'évolution future des fromages.

- **Affinage** : sous l'influence des systèmes enzymatiques présents à l'origine dans le lait (enzymes endogènes), des agents coagulants et des flores microbiennes d'intérêt, de nombreuses réactions chimiques et biochimiques se déroulent simultanément ou successivement au sein du caillé. Elles sont à l'origine de modifications plus ou moins importantes de sa composition qui dépendent non seulement de sa structure initiale mais également des conditions environnementales dans lequel le fromage est affiné (température, humidité relative, ...).

En technologie fromagère, les bactéries lactiques interviennent tout au long des différents processus de transformation du lait en fromage. Par leur activité acidifiante, elles conditionnent, pour une grande part, l'aptitude du lait à la coagulation, l'aptitude du caillé à l'égouttage et la composition finale du fromage ; par leurs activités protéolytique, aromatique, texturante et gazogène, elles déterminent les principales caractéristiques organoleptiques du produit fini. Ces bactéries lactiques proviennent généralement des levains lactiques commerciaux mais sont aussi présentes dans le lait cru et dans l'environnement laitier.

### **I.3.2. Incidence des bactéries lactiques atypiques en fabrication fromagère**

Les bactéries lactiques atypiques ou non conventionnelles, présentes dans certains fromages au lait cru, sont en relation avec les conditions de production du lait ou des facteurs environnementaux. Elles peuvent souvent être considérées comme des « contaminations » avantageuses des fromages en leur conférant une plus grande typicité (Peterson et Marshall 1990 ; Martley et Crow 1993 ; Skeie et Ardo 2000). Ces

bactéries « opportunistes » comprennent des lactobacilles, des pédiocoques et des carnobactéries (Millière *et al.*, 1994 ; Crow *et al.*, 2001 ; Chammas *et al.*, 2006 ; Cailliez-Grimal *et al.*, 2007). Lors de la fabrication fromagère, les niveaux de population en bactéries lactiques augmentent rapidement dans le laitensemencé, puis dans le caillé pour atteindre  $10^8$  -  $10^{10}$  ufc.g<sup>-1</sup>, puis baissent considérablement après un mois d'affinage pour atteindre approximativement 1 % du niveau maximal (McSweeney *et al.*, 1993). En revanche, la population en bactéries lactiques atypiques augmente graduellement d'un niveau quasi insignifiant dans le lait ou en début de fabrication à la domination de cette flore dans le fromage affiné (Peterson et Marshall 1990). Contrairement aux bactéries lactiques du levain, ces bactéries atypiques tolèrent mieux l'environnement hostile de certains fromages pendant l'affinage qui peut être caractérisé par exemple par 39 % d'humidité, 4-6 % de sel, pH 4,9-5,0 à 13 °C et par une carence en nutriments (Fryer *et al.*, 1967 ; Morea *et al.*, 2007). Dans le fromage, elles sont capables d'utiliser le lactate, les acides aminés, le ribose et le N-acétylamino-glucoside comme seules sources de nutriment (Thomas et Pritchard 1987).

Des bactéries mésophiles atypiques sont souvent présentes dans les fromages suite à des post-contaminations survenant après la pasteurisation du lait ; elles peuvent également constituer une microflore naturelle du lait, résistante à la pasteurisation (Rynne *et al.*, 2007). Leur rôle dans l'affinage des fromages n'est pas encore bien élucidé, bien que la supplémentation des levains lactiques traditionnelles avec des bactéries lactiques atypiques ou l'utilisation du lait cru pour la fabrication des fromages augmente les taux d'acides aminés libres, de peptides et d'acides gras libres. Ces modifications accroissent l'intensité de la saveur tout en accélérant l'affinage des fromages (Franklin et Sharpe 1963 ; McSweeney *et al.*, 1993 ; Lane et Fox 1996 ; Lynch *et al.*, 1996 ; Lane et Fox 1997 ; Corsetti *et al.*, 1998). La comparaison des activités enzymatiques lipolytiques et protéolytiques, de levains et de bactéries lactiques atypiques, par la méthode quadratique des surfaces de réponse, montre une grande adaptation aux conditions fromagères de plusieurs enzymes de lactobacilles mésophiles atypiques (Gobbetti *et al.*, 1999a). D'autres applications ont rapporté l'adaptation des peptidases de certaines bactéries atypiques mésophiles à ces changements (Gobbetti *et al.*, 1999b). L'abondance relative de certaines espèces bactériennes et la diversité des bactéries lactiques atypiques dans certains fromages peuvent modifier favorablement leur saveur.

### **I.3.3. Présence opportuniste de *C. maltaromaticum* dans des fromages**

Une cartographie de la présence de *C. maltaromaticum* dans les fromages français à pâte molle a révélé la présence de cette bactérie lactique atypique dans certains fromages au lait cru ou au lait thermisé ; plus particulièrement les fromages d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) au lait de vache, de chèvre ou de brebis (Millière *et al.*, 19994 ; Cailliez-Grimal *et al.*, 2007). Ces fromages sont produits à l'échelle industrielle ou semi-industrielle, selon des technologies différentes en fonction de traditions locales ou régionales. Le contenu en bactéries lactiques atypiques des fromages au lait cru peut être un des facteurs qui détermine leur typicité (De Angelis *et al.*, 2000). Son étude pourrait permettre de sélectionner les bactéries lactiques atypiques à fort potentiel technologique et aromatique afin de les introduire comme complément dans les levains lactiques traditionnels lors de fabrication de fromages au lait pasteurisé. Ce procédé permettrait de reproduire des saveurs proches de celles des fromages au lait cru, en utilisant du lait pasteurisé, et d'accélérer l'affinage de certaines variétés de fromages. Afin d'atteindre ces objectifs, la numération sélective des bactéries lactiques atypiques est une nécessité, car elle permettra de suivre le comportement de ce genre bactérien lors des différentes phases de la fabrication du fromage. Plusieurs stratégies sont envisageables, soit la création d'un milieu de culture sélectif, soit l'utilisation de la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) et de la PCR quantitative, étape qui nécessite le choix des amorces spécifiques et l'optimisation des conditions opératoires.

### **I.4. PRODUCTION DE COMPOSES SAPIDES PAR DES BACTERIES LACTIQUES**

Le métabolisme énergétique des bactéries lactiques est exclusivement fermentaire, soit homofermentaire soit hétérofermentaire, selon l'espèce bactérienne :

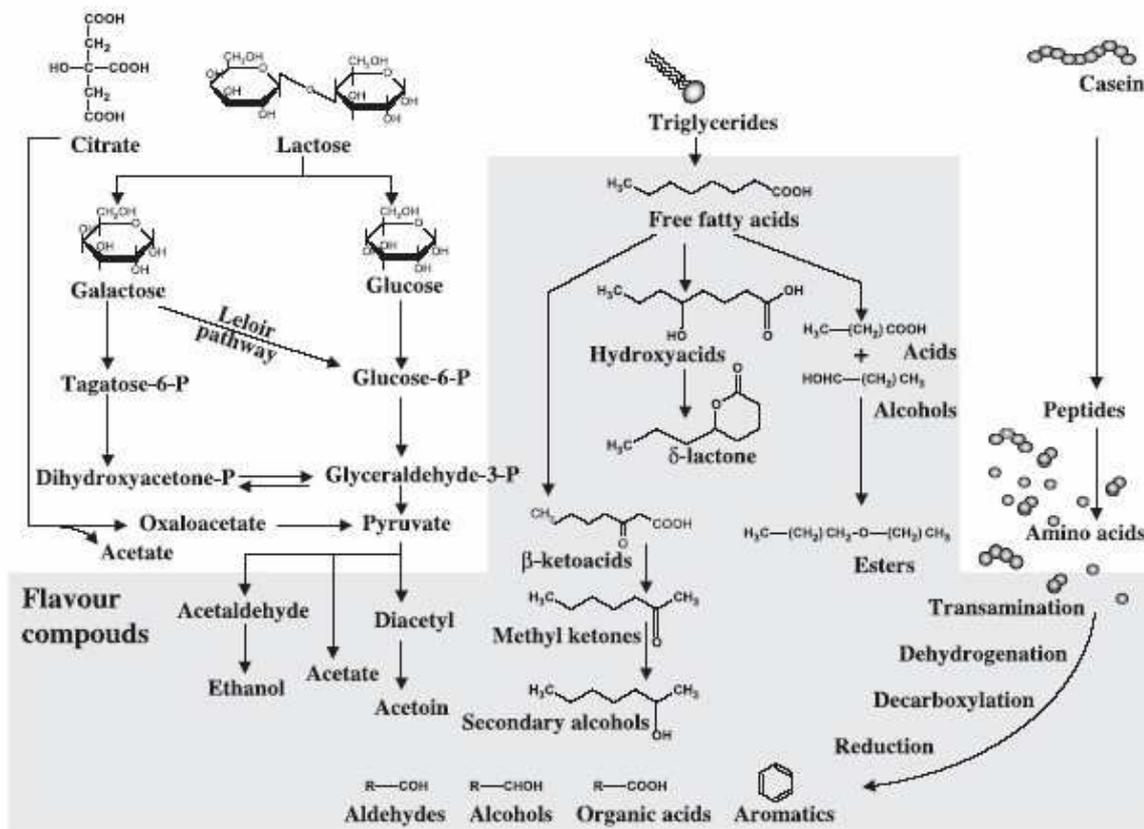
- les bactéries lactiques homofermentaires convertissent la quasi totalité du glucose en acide lactique (90-95 %). Deux moles d'ATP et deux moles d'acide lactique sont produites par mole de glucose fermenté ;
- les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent moins de 1,8 mole d'acide lactique par mole de glucose et également de l'éthanol et/ou de l'acétate et du dioxyde de carbone. L'acide lactique représente environ 50 % des produits finaux ; une seule mole d'ATP est produite.

L'industrie fromagère « exploite » le métabolisme des bactéries lactiques pour la fabrication des fromages. Au cours de ce processus, les bactéries présentes dans le lait métabolisent ses trois constituants que sont les glucides (lactose), les lipides (triglycérides) et les protéines (caséine et azote soluble).

#### **I.4.1. Hydrolyse du lactose et des lipides**

Les principales molécules aromatiques du fromage sont produites lors de la glycolyse, de la lipolyse et de la protéolyse, selon différentes voies métaboliques (Figure 2). Dans le lait, le lactose est hydrolysé par les bactéries lactiques en glucose et en galactose (galactose-6-phosphate pour les lactocoques). Le glucose est dégradé en pyruvate par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas de la glycolyse puis réduit en acide lactique. Le galactose est fermenté par les bactéries galactose-positives et celles appartenant au genre *Leuconostoc*, via la voie de Leloir, en glucose-6-phosphate, et par les lactocoques en glycéraldéhyde-3-phosphate, via la voie du tagatose. Le pyruvate est le précurseur des composés aromatiques à courtes chaînes tels que le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, l'acétaldéhyde et l'éthanol (Marilley et Casey 2004).

Les lipides peuvent être oxydés ou hydrolysés. Cependant, l'oxydation est limitée en raison du faible potentiel rédox des fromages. La lipolyse des triglycérides du lait libère des acides gras à chaînes courtes ou à chaînes intermédiaires. Les acides gras à courte chaîne ont un impact sur la flaveur des fromages. Cependant, une lipolyse intense est indésirable pour la plupart des fromages en raison du développement de la rancidité. L'oxydation et la décarboxylation des acides gras produisent des méthylcétones et des alcools secondaires et l'estérification des hydroxyacides donne des lactones. Les acides gras réagissent avec les groupes alcools pour former des esters tels que l'éthylbutanoate, l'éthylhexanoate, l'éthylacétate.... Les bactéries lactiques ont en général une faible activité lipolytique (Molimard et Spinnler, 1996).

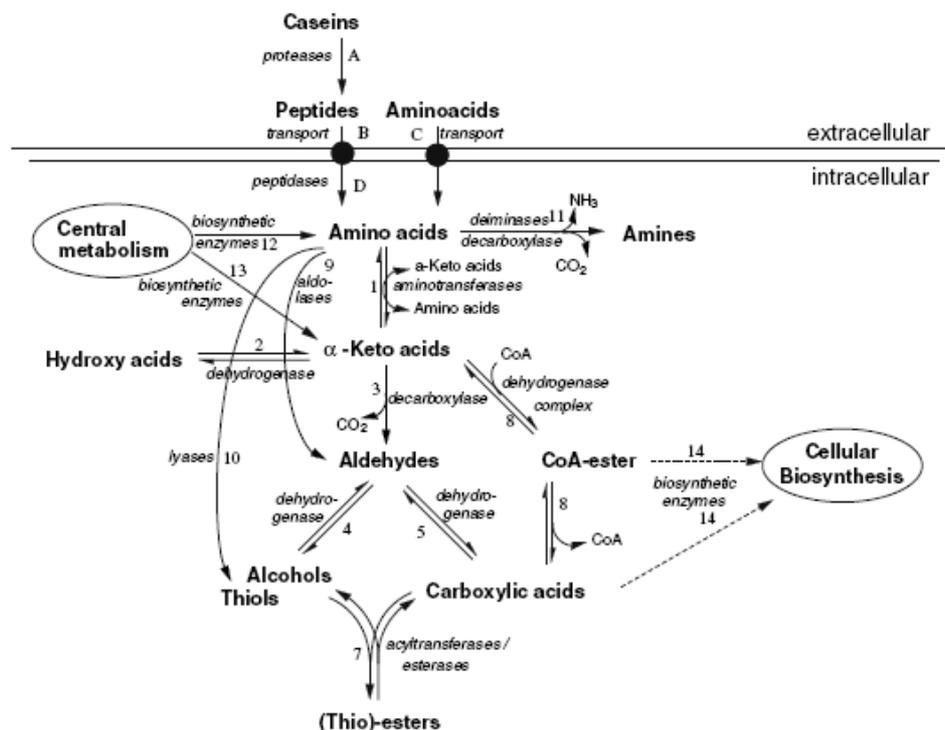


**Figure 2** : Schéma général de la production de molécules aromatiques dans le fromage à partir du lactose, des triglycérides, de la caséine et du citrate (Marilley et Casey 2004).

#### I.4.2. Métabolisme des acides aminés

La dégradation des caséines, par l'activité enzymatique de la présure (chymosine et pepsine), des protéinases des parois membranaires et des peptidases des bactéries lactiques, est à l'origine de la production de petits peptides et d'acides aminés libres (Figure 3). Cette conversion de la caséine contribue directement à la saveur des fromages. La première étape du catabolisme des acides aminés pourrait être la décarboxylation, la désamination ou leur dégradation par des enzymes appartenant à l'un des cinq groupes suivants : décarboxylases, transaminases, désaminases, lyases et déshydratases. Les acides aminés donnent ainsi une grande variété de composés aromatiques tels que l'acide phénylacétique, le phényléthanol, le p-crésol, le méthanthiol, le diméthylsulfure, le 3-méthylbutyrate, le 3-méthylbutanal, le 3-méthylbutanol, le 3-méthyl-2-butanone, le 2-méthylpropionate, le 2-méthyl-1-propanal, le 2-méthylbutyrate et le 2-méthylbutanal (Curioni et Bosset 2002) (Tableau 4). Les différentes étapes du métabolisme des peptides et des acides aminés sont rapportées

dans la figure 3, et indiquées dans le texte par des lettres et des numéros placés entre parenthèse. Afin d'obtenir les acides aminés nécessaires à la production de composés volatils, les bactéries doivent dégrader la caséine et les petits peptides du milieu environnant par l'action de protéases et de peptidases (A-D). Dans le milieu intracellulaire, ces acides aminés sont convertis en  $\alpha$ -cétoacides correspondants (1) ; la leucine par exemple est convertie en acide  $\alpha$ -cétoisocaproïque (Smit *et al.*, 2005). Ces  $\alpha$ -cétoacides constituent des intermédiaires centraux du métabolisme (13) intervenant dans la biosynthèse cellulaire ; les  $\alpha$ -cétoacides peuvent aussi être convertis en  $\alpha$ -hydroxy-acides (2) et en aldéhydes (3) responsables de la flaveur maltée (Avsar *et al.*, 2004). Ces aldéhydes donnent soit des alcools (4), soit des acides organiques (5). Une autre conversion importante des acides aminés est la décarboxylation qui génère des amines (11) présentes dans les produits fermentés. La troisième conversion des acides aminés, initiée par les lyases (10) forme des alcools. Les bactéries lactiques utilisent aussi les acides aminés pour synthétiser des protéines mais également comme source d'énergie pour obtenir le pH interne favorable à leur développement, dans un environnement acide, pour générer les co-substrats et pour la biosynthèse (Ardo, 2006).



**Figure 3 :** Voie de conversion des protéines pour la formation des composés aromatiques (Smit *et al.*, 2005). Les chiffres et les lettres font références au texte.

Les activités enzymatiques, qui interviennent dans le catabolisme des acides aminés, dépendent des conditions environnementales, pH, température, activité de l'eau et disponibilité en co-substrats. Le catabolisme des acides aminés commence généralement par l'élimination du groupe amine par les aminotransférases. Les bactéries lactiques sont équipées d'aminotransférases spécifiques à différents groupes tels que les acides aminés à chaînes branchées (Leu, Ile et Val), aromatiques (Phe, Tyr et Trp), soufrés (Cys et Met) ou acides (Asp), produisant des céto-acides spécifiques à chaque acide aminé.

**Tableau 4 :** Composés aromatiques issus du catabolisme des acides aminés par la voie des transaminases des bactéries lactiques (Smit *et al.*, 2005)

Acides aminés	Céto-acides	Aldéhydes	Acide organiques	Alcools (thiol)	Esters
<b>Ile</b>	Acide $\alpha$ -céto-3-méthyl-pentanoïque	2-méthylbutanal	Acide 2-méthylbutyrique	2-méthylbutanol	
<b>Leu</b>	Acide $\alpha$ -cétoisocaproïque	3-méthylbutanal	Acide 3-méthylbutyrique	3-méthylbutanol	Ethyl 3-méthylbutanoate
<b>Val</b>	Acide $\alpha$ -isovalérique	2-méthylpropanal	Acide 2-méthylpropanoïque	2-méthylpropanol	Ethyl-isobutanoate
<b>Phe</b>	Phényl pyruvate	Phénylacétaldéhyde	Acide phénylacétique	Phényléthanol	Phénylacétate
<b>Trp</b>	Indole 3-pyruvate	Indole-3-acétaldéhyde	Acide indole-3-acétique		
<b>Met</b>	$\alpha$ -céto-méthylthio butyrate	Méthional	Acide méthylthiobutyrique	Méthionol	

L'aminotransférase de *Leuconostoc* sp. et des lactobacilles nécessite le pyridoxal-5-phosphate comme co-facteur (Smit *et al.*, 2005). Cette enzyme utilise l' $\alpha$ -cétoglutarate comme accepteur du groupe amine afin de produire le glutamate. Les  $\alpha$ -céto-acides provenant de la dégradation des acides aminés branchés contribuent à la flaveur des fromages. Ils sont ensuite hydrolysés en aldéhydes, alcools et acides carboxyliques qui participent également à la flaveur des fromages.

**I.4.2.1. Les composés aromatiques dans les fromages**

Les produits laitiers contiennent un grand nombre de molécules volatiles et odorantes, perceptibles soit par olfaction directe, qui donnent l'odeur, soit par olfaction rétronasale, qui caractérisent l'arôme. La flaveur regroupe l'ensemble de ces deux perceptions. En industrie fromagère, la qualité des fromages est largement déterminée par la perception sensorielle qui est un processus complexe. Elle est influencée par plusieurs facteurs tels que le contenu en composés aromatiques, la texture et l'apparence. Plus de 600 composés aromatiques ont été identifiés dans les fromages affinés (Curioni et Bosset 2002). Une faible fraction d'entre eux est responsable de la flaveur caractéristique d'un fromage. Leurs quantités et proportions conditionnent l'acceptation du produit. Les différents composés aromatiques trouvés dans certains fromages sont rapportés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Composés aromatiques identifiés dans quatre types de fromage (Smit *et al.*, 2005).

Métabolisme	Gouda	Cheddar	Camembert	Petit-suisse et Maasdam
<b>Acides aminés</b>	3-méthylbutanal	3-méthylbutanal	3-méthylbutyrate	Méthional
	3-méthylbutanol	Acide isovalérique	3-méthylbutanal	3-méthylbutanal
	Méthanethiol	DMS	Méthional	3-méthylindole
	Diméthylsulfure (DMS)	DMTS	Méthanethiol	
	2-méthylpropanal Diméthyltrisulfure (DMTS)		DMS Benzaldéhyde Phénylacétaldéhyde	
<b>Glucides</b>	Diacétyle	Acide propionique Diacétyle	2,3-butanedione	Acide propionique Diacétyle
	Acide butyrique Butanone Hexanal Pentanal	Acide butyrique Acide acétique 1-octen-3-one Butanone	1-octen-3-ol Acide butyrique 1-octène-3-one 1-undecalactone $\alpha$ -docalactone	
<b>Autres et voie combinée</b>	Ethylbutyrate Limonène	Ethylbutyrate Ethylhexanoate	Phényléthylacétate	Ethylbutyrate Ethylhexanoate Ethyl-3-méthylbutanoate Phényléthylacétate

### \* Les composés maltés

Depuis Miller III en 1974, la production de composés à arôme malté a été décrite chez l'espèce *Lb. maltaromicus* en culture dans le lait. L'élaboration de ces produits dépend du métabolisme des souches et de la nature des acides aminés présents. Les aldéhydes à chaînes branchées comme le 3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal et le 2-méthylpropanal, provenant de la dégradation de la leucine, de l'isoleucine et de la valine (Tableau 6), sont responsables de la flaveur maltée des fromages ; à de faibles concentrations, cette flaveur devient fruitée et très agréable (Curioni et Bosset, 2002 ; Avsar *et al.*, 2004). De même, les alcools primaires à chaînes branchées, provenant de la réduction de ces aldéhydes, confèrent aux fromages un arôme agréable de fromage frais, de crème ou de pétales de rose (Avsar *et al.*, 2004). En revanche, les acides, issus de la dégradation des acides aminés branchés, donnent des odeurs désagréables comme des odeurs de rance, de sueur ou de pieds sales (Kubickova et Grosch, 1998a).

**Tableau 6** : Composés aromatiques intervenant dans la flaveur des fromages

Composés volatils	Origine	Descripteur d'arome	références bibliographiques
<b>Acides</b>			
Acide isobutyrique	Valine	rance, pomme, sueur	Kubickova et Grosch 1998a
Acide isovalérique	Leucine	rance, fromage, pied, faecale, pourriture	Kubickova et Grosch 1998a
Acide 2-méthylbutanoïque	Isoleucine	fruité, cireux, sueur	
Acide isocaproïque	Leucine	fromage, sucré, pieds	
<b>Aldéhydes</b>			
2-méthylpropanal	Valine	floral	Rychlik et Bosset 2001 Kubickova et Grosch 1998a, Kubickova et Grosch 1998b
3-méthylbutanal	Leucine	malté	Kubickova et Grosch 1998a
2-méthylbutanal	Isoleucine	malté	Kubickova et Grosch 1998a
<b>Alcools</b>			
2-méthylpropanol	Valine	plastique	Thierry et Maillard 2002
3-méthylbutanol	Leucine	fruité, alcool, granuleux	
2-méthylbutanol	Isoleucine		

### **I.4.3. Les bactéries lactiques impliquées dans la production de composés aromatiques**

La décarboxylation des  $\alpha$ -céto-acides à chaînes branchées entraîne la formation, à une concentration très basse, du 3-méthylbutanal, du 2-méthylbutanal, et du 2-méthylpropanal, composés à flaveur maltée ou chocolatée. Leur production a été mise en évidence chez *Lb. casei*, *Lc. lactis* ssp. *maltigenes* et *Lc. lactis* « sauvage » (Ayad *et al.*, 1999 ; Smit *et al.*, 2005). La plupart des lactocoques produisent une faible quantité de ces aldéhydes suggérant une faible expression des gènes codant pour les décarboxylases. Pour ces espèces bactériennes, ces composés seraient rapidement convertis en d'autres produits. Smit *et al.* (2004), en étudiant les  $\alpha$ -céto-acide décarboxylases impliquées dans la formation du 3-méthylbutanal, ont montré que ce composé était produit par un nombre restreint de souches de bactéries lactiques. En revanche, l'acide 3-méthylbutyrique, issu de son oxydation, est élaboré par un nombre plus élevé de bactéries lactiques. L'absence d'aldéhyde, mais la présence d'acides organiques correspondants, peut s'expliquer par l'action des  $\alpha$ -céto-acides décarboxylases plutôt que celle d'une conversion rapide des aldéhydes en acides organiques (Thierry et Maillard, 2002).

Ayad *et al.* (1999, 2003), en comparant la production des composés aromatiques par des souches sauvages et par des souches commerciales de *Lc. lactis*, ont montré que les souches sauvages possédaient une activité plus élevée car elles ne dégradent pas la caséine, produisaient des composés antimicrobiens et étaient faiblement acidifiantes. Ces souches sauvages avaient un équipement enzymatique leur permettant de synthétiser leurs propres acides aminés, comparativement aux souches commerciales. Les lactocoques commerciaux sont connus pour leur faible capacité à biosynthétiser les acides aminés ce qui explique leur exigence nutritionnelle complexe. La plupart de ces souches nécessitent pour leur croissance du glutamate, de la valine, de la méthionine, de l'histidine, de la sérine, de la leucine et de l'isoleucine. Chez les lactocoques lactiques, l'absence des enzymes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés peut être la conséquence de leur adaptation aux produits laitiers, car des acides aminés sont disponibles en quantités plus ou moins importantes dans le lait. Les bactéries lactiques qui ne sont pas associées à un environnement nutritionnellement favorable, comme le lait, sont tributaires de leur propre biosynthèse d'acides aminés.

#### **I.4.3.1. Production de composés maltés par *C. maltaromaticum***

Le 3-méthylbutanal, le 3-méthylbutanol et l'acide 3-méthylbutanoïque, provenant du catabolisme de la leucine, ont un impact sur la qualité sensorielle des fromages en leur conférant une saveur maltée (Curioni et Bosset, 2002 ; Avsar *et al.*, 2004). En effet, la conversion de la leucine en 3-méthylbutanal par *S. lactis* var. *multigenes* (renommé *C. maltaromaticum*) était responsable de la production de l'arôme malté dans le lait (Sheldon *et al.*, 1971, cité par Larrouture *et al.*, 2000). De même, dans des circonstances non déterminées, Miller III *et al.* (1974) avaient isolé *Lb. maltaromicus* de lait présentant une odeur de malt. Les travaux de Larrouture *et al.* (2000) et de Larrouture-Thiveyrat *et al.* (2003) ont montré que *C. piscicola* 545 produisait du 3-méthylbutanal au cours du métabolisme de la leucine. La présence de *C. maltaromaticum* dans un écosystème bactérien complexe comme le fromage (Millière *et al.*, 1994) ne permet pas d'évaluer sa contribution dans la production de saveurs maltées ; il serait donc intéressant d'étudier la production de composés aromatiques par *C. maltaromaticum* dans le lait et dans les fromages à pâte molle.

#### **I.4.4. Application en industrie fromagère**

Les souches qui possèdent les enzymes spécifiques pour la production de composés aromatiques n'ont pas toujours les enzymes nécessaires pour compléter cette voie. De plus, ces souches peuvent être déficientes en d'autres caractéristiques, indispensables en fabrication fromagère, comme leur acidification rapide du lait. Dans le but d'exploiter leurs propriétés aromatiques, il faudrait les combiner avec des souches industrielles afin d'obtenir un levain qui posséderait deux propriétés recherchées, acidification et aromatisation (Ayad *et al.*, 2001 ; Ayad *et al.*, 2002). Ainsi, la combinaison de *Lc. lactis* B1157 et de *Lc. lactis* SK110 améliore la production de 3-méthylbutanal. *Lactococcus lactis* SK110, souche fortement protéolytique d'origine industrielle, ne peut pas dégrader la leucine pour produire le 3-méthylbutanal, en raison de l'absence de décarboxylase ; la souche sauvage B1157, non protéolytique, possède une activité décarboxylasique élevée. Cette association de souches offre de nouvelles possibilités pour la formulation d'un levain à fort potentiel technologique (Ayad *et al.*, 2001).

Dans les produits fermentés, notamment le fromage, la dégradation de la caséine est la principale voie de formation des composés aromatiques. Car la protéolyse et la peptidolyse sont des prérequis pour la génération d'acides aminés libres. Ainsi, une dégradation de la caséine maîtrisée est importante au plan aromatique afin de prévenir l'accumulation de peptides amers.

Les composés aromatiques volatils, qui déterminent la typicité des fromages, proviennent de l'activité des enzymes qui convertissent les acides aminés. Chez les bactéries lactiques, la fonction physiologique de ces enzymes est davantage dirigée vers la biosynthèse d'acides aminés. Cette caractéristique est très importante au plan pratique, car l'activité du levain peut être influencée par les conditions culturelles. Les bactéries lactiques regroupent une grande diversité d'espèces qui offrent des potentialités intéressantes pour l'augmentation de la flaveur et la diversification des produits laitiers. Cependant, la présence des acides aminés libres dans un aliment peut aussi conduire à la production d'amines biogènes par les décarboxylases bactériennes.

#### **1.4.5. Les amines biogènes**

Les amines biogènes sont des bases organiques de faible poids moléculaire provenant du métabolisme des cellules animales, végétales ou microbiennes. Elles possèdent une structure aliphatique (putrescine, cadavérine, spermine et spermidine), aromatique (tyramine, phényléthylamine) ou hétérocyclique (histamine, tryptamine). Dans le domaine alimentaire, les amines biogènes, souvent d'origine microbienne, résultent de la décarboxylation des acides aminés, de l'amination des cétones ou des aldéhydes et de l'hydrolyse de composés azotés (Santos, 1996). Certains aliments fermentés renferment des quantités importantes d'amines biogènes suite à l'activité de décarboxylases microbiennes (Santos, 1996). Les amines biogènes peuvent aussi être d'origine endogène, mais elles sont présentes seulement à de faibles concentrations dans les aliments non fermentés comme les fruits, les légumes, la viande, le lait ou le poisson. La plupart de ces amines endogènes possèdent de fortes activités biologiques et physiologiques (Shalaby 1996). Elles sont également présentes dans une grande variété d'aliments comme le chocolat, la choucroute, les produits de la mer, la bière, le vin, le fromage... Les amines biogènes trouvées dans les aliments, ainsi que leurs acides aminés précurseurs, sont rapportées dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Principales amines biogènes trouvées dans les produits alimentaires (ten Brink *et al.*, 1990)

Acides aminés	Amines biogènes
<i>Basiques</i>	<i>Polyamines</i>
Ornithine	Putrescine
Lysine	Cadavérine
Arginine	Agmatine, Spermidine, Spermine
<i>Aromatiques</i>	<i>Monoamines</i>
Tyrosine	Tyramine
Phénylalanine	Phényléthylamine
<i>Hétérocycliques</i>	<i>Hétérocycliques</i>
Histidine	Histamine
Tryptophane	Tryptamine

#### 1.4.5.1. Rôle des amines biogènes

Les amines biogènes ont des rôles physiologiques et pharmacologiques importants. Elles se forment et se dégradent pendant le processus métabolique normal des cellules vivantes comme la régulation de la croissance (spermine, spermidine et cadavérine), la transmission nerveuse (catécholamine et sérotonine) et les médiateurs d'inflammation (histamine et tyramine) (Onal, 2007). Ces amines biogènes jouent un rôle notable dans des fonctions physiologiques telles que la régulation de la température corporelle, du pH de l'estomac et de l'activité cérébrale. Les amines biogènes, sources du groupement NH<sub>2</sub>, servent également de précurseurs pour la synthèse d'hormones, d'alcaloïdes, d'acides nucléiques et de protéines. Dans des aliments, ce sont des composés aromatiques de premier plan (Santos, 1996). Les polyamines sont impliquées dans les processus physiologiques importants comme le développement et la croissance des fruits (Esti *et al.*, 1998) ; elles ont par ailleurs un autre intérêt physiologique lié à la stabilisation de la membrane et à la prolifération cellulaire puisqu'elles impliquent l'ADN et l'ARN et la synthèse protéique (Bardocz, 1993). Elles sont considérées comme des microcomposants alimentaires importants pendant la période de croissance cellulaire intense (développement intestinal des nourrissons et rétablissement post-

opérationnel), bien que dans certains cas pathologiques (tumeurs), leur consommation doive être minimisée (Bardocz, 1993).

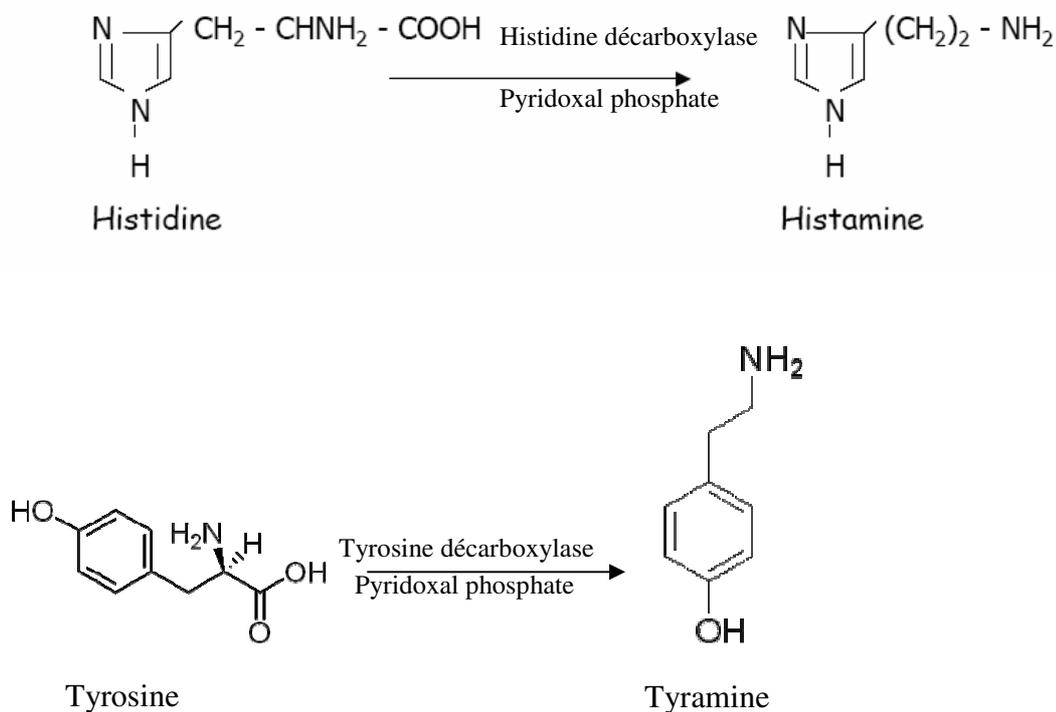
#### **I.4.5.2. Toxicité des amines biogènes**

Les amines biogènes sont à l'origine d'intoxications directes ou indirectes du système nerveux ou du système vasculaire humain. La tyramine, la tryptamine et la  $\beta$ -phényléthylamine sont impliquées dans les crises d'hypertension (Shalaby, 1996 ; Parente *et al.*, 2001). En général, les amines biogènes peuvent provoquer des urticaires, des maux de tête, des nausées, de l'hypotension, des palpitations cardiaques, des hémorragies intracérébrales et des chocs anaphylactiques spécialement si de l'alcool et des monoamines oxydases ont été ingérés au même moment (Lange et Wittmann, 2002). Les amines biogènes, comme la putrescine et la cadavérine jouent un rôle important dans l'intoxication alimentaire en renforçant la toxicité de l'histamine (Bjeldanes *et al.*, 1978). Dans les aliments, Nout (1994) recommande des concentrations en tyramine et en histamine comprises respectivement entre 50 et 100 mg et entre 100 et 800 mg ; une concentration supérieure à 1080 mg de tyramine devient toxique. La putrescine, la spermidine, la spermine et la cadavérine n'ont pas d'effet toxique direct sur la santé mais peuvent réagir avec les nitrites pour former des nitrosamines cancérigènes ; la formation de ces nitrosamines constitue un risque toxicologique additionnel associé aux amines biogènes, spécialement dans les produits carnés (Scanlan, 1983). Dans le cas spécifique du fromage, il est possible d'utiliser les amines biogènes comme paramètre de qualité hygiénique de production et comme indicateur du degré de protéolyse et de typicité de certains fromages (Innocente *et al.*, 2007). La quantification des amines biogènes peut aussi être considérée comme un paramètre d'évaluation du degré de détérioration des aliments (Leuschner et Hammes, 1999) ; il est par conséquent important de maîtriser leurs productions.

#### **I.4.6. Les bactéries impliquées dans la production des amines biogènes**

Les amines biogènes peuvent être produites, lors du stockage ou du procédé de fabrication des aliments (fromages, poisson et produits carnés), par des décarboxylases bactériennes des bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Lactobacillus* et *Enterococcus* (Udenfriend *et al.*,

1959 ; Halasz *et al.*, 1994). Ces décarboxylases possèdent une spécificité extrêmement étroite. Elles utilisent le pyridoxal-5-phosphate comme coenzyme (Figure 4). Une corrélation positive a été constatée entre la formation d'amines biogènes et la croissance de certains micro-organismes (Jorgensen *et al.*, 2000 ; Marino *et al.*, 2000). De nombreux micro-organismes, appartenant aux bactéries à Gram-positif, comme les bactéries lactiques, sont capables de décarboxyler un ou plusieurs acides aminés et de produire des amines biogènes. *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc* spp. produisent des quantités variables de tyramine (5 à 800 mg/L) et de la tryptamine en faible quantité, dans le milieu de décarboxylation décrit par Falkow (1958) supplémenté en tyrosine, histidine et tryptophane (de Llano *et al.*, 1998). Le genre *Carnobacterium* produit de la tyramine dans du poisson emballé sous vide (Leisner *et al.*, 1994) et dans la viande (Masson *et al.*, 1999). Les études de Masson *et al.* (1996) ont montré que *C. maltaromaticum* pouvait en produire  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le milieu de Maijala (1993) supplémenté avec 2 % (v/v) d'histidine et de tyrosine.



**Figure 4:** Formation d'amines biogènes à partir d'acides aminés précurseurs : exemples de l'histamine et de la tyramine

En revanche, les micro-organismes qui possèdent une activité oxydasique sont capables de dégrader les amines biogènes. Des amines oxydases catalysent la déamination oxydative des amines primaires en produisant des aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniaque. Des bactéries intervenant dans la maturation de certains fromages sont capables de dégrader les amines biogènes comme *Brevibacterium linens* et des bactéries corynéformes qui métabolisent faiblement l'histamine et la tyramine (Leuschner et Hammes, 1999). Ces données doivent être prises en compte lors de la préparation des levains en fabrication fromagère. En effet, l'addition d'un cocktail de souches lactiques productrices d'amines biogènes pourrait augmenter de façon considérable leur concentration dans le produit. Au contraire, le choix d'un levain non producteur d'amines biogènes ou possédant une activité amine oxydasique permettrait de stabiliser leur production voire de réduire leur accumulation.

## **I.5. TEXTURE DU GEL LACTIQUE**

### **I.5.1. Acidification du lait**

La fermentation du lait est une étape importante de la fabrication des produits laitiers fermentés. Les changements physico-chimiques induits par l'acidification du lait exercent une influence majeure sur la texture et l'acceptabilité du produit fini (Lucey et Singh, 1997 ; Horne, 1999; Tranchant *et al.*, 2001).

La coagulation du lait est réalisée en vue d'exploiter une propriété particulière des gels lactiques, qui est leur égouttage spontané. Cette étape se traduit par la séparation progressive de la majorité de l'eau constitutive du lait, sous forme de lactosérum d'un substrat semi-solide, constituant le fromage. La coagulation correspond à une déstabilisation irréversible de la structure micellaire originelle du lait. Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières distinctes :

- par voie enzymatique, à l'aide d'enzymes coagulantes en particulier la présure ;
- par voie fermentaire, à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique.

Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents, bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un coagulum (De Roissart, 1986).

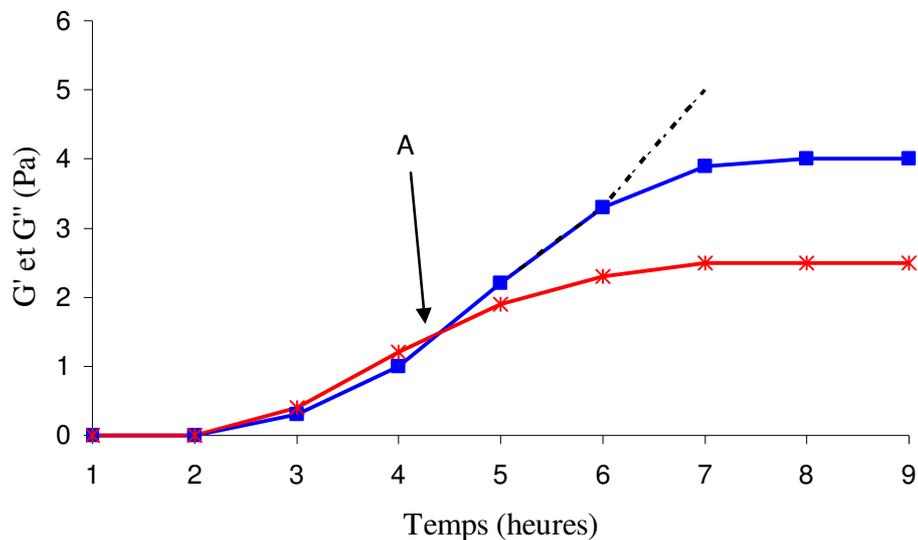
Le mécanisme de la coagulation acide est de nature électrochimique quel que soit le processus envisagé ; la micelle de caséine, au pH initial du lait (6,60), est chargée négativement. Elle est entourée d'une couche d'eau contenant des sels minéraux. La stabilité du lait est assurée par la répulsion électrostatique de ces micelles. L'addition ou la production d'acide entraîne une modification de la charge globale négative, car les ions  $H^+$  libérés par dissociation des groupements acides du phosphate de calcium, neutralisent progressivement les charges électronégatives. La répulsion électrostatique des micelles diminue au fur et à mesure de l'enrichissement du milieu en ions  $H^+$ , puis s'annule. A température ambiante, les micelles commencent à s'agréger vers le pH 5,2. Lorsque le pH isoélectrique de la caséine est atteint (pH 4,6) la coagulation est totale. (De Roissart 1986).

Dans la coagulation enzymatique ou présure, le site d'action de la chymosine est la caséine Kappa qui joue le rôle de colloïde protecteur contre l'insolubilisation de la micelle de caséine dans le lait. La coupure de la liaison peptidique 105 (Phénylalanine)-106 (méthionine) de la caséine kappa par cette endopeptidase, conduit à l'insolubilisation de la micelle de phosphoparacaséinate de calcium et à la libération d'un composé hydrophile, fraction 106-169 de la caséine kappa, dénommé caséinoglycomacropeptide. Les micelles de caséine ainsi dénaturées se lient progressivement entre elle par des liaisons faisant intervenir du calcium et du phosphore, à l'origine du caillé présure. Sa contractibilité importante leur permettra d'expulser le lactosérum (De Roissart *et al.*, 1986).

### **I.5.2. Détermination des propriétés rhéologiques**

Les propriétés rhéologiques du coagulum dépendent du mode de coagulation (Lucey *et al.*, 1998). Elles étaient empiriquement mesurées par les tests de fermeté ou de viscosité. Cependant, la plupart des paramètres rhéologiques caractérisant un gel lactique dépendent du nombre et de la force des liaisons entre les micelles de caséine, de leur structure et de leur distribution spatiale (Lucey *et al.*, 1997). Les tests dynamiques, entraînant l'application d'une contrainte oscillatoire, permettent l'obtention des données sur la formation du gel. Lors des essais à contraintes imposées, l'échantillon est soumis à une contrainte oscillatoire sinusoïdale, générant une réponse à la déformation. L'amplitude de cette déformation et sa différence de phase selon la

contrainte sont mesurées (Lucey *et al.*, 2003). Les principaux paramètres qui découlent de cette réponse sont le module visqueux de conservation ( $G'$ ) qui correspond à l'énergie conservée par cycle d'oscillation et le module élastique de perte ( $G''$ ) qui correspond à l'énergie perdue sous forme de chaleur ; le paramètre  $\text{Tan}\delta$  est le rapport de ces deux modules ( $G'/G''$ ) (Kristo *et al.*, 2003). La courbe typique de la gélification du lait est illustrée par la figure 5. Le temps de départ ( $t = 0$ ) correspond au moment de l'addition de l'agent acidifiant ; il existe un « temps de retard » avant que les propriétés rhéologiques ne dépassent une certaine valeur ; ce temps correspond au temps d'adaptation ou de latence. Ensuite, les modules  $G'$  et  $G''$  augmentent pour atteindre ou non un plateau, suivant les conditions expérimentales (Gunasekaran et Mehmet 2000).



**Figure 5** : Courbe typique de la transition sol-gel en fonction du temps montrant les différentes phases de formation du gel (Gunasekaran et Mehmet 2000).

(A) : point de coagulation ; (■) : module de conservation  $G'$  ; (\*) : module de perte  $G''$

La variation des modules  $G'$  et  $G''$  traduit un changement de structure du milieu. Lorsque la valeur de  $G'$  devient supérieure à celle de  $G''$ , le système a gélifié correspondant au temps de gel. Ensuite, le gel évolue avec l'acidification du milieu pour atteindre ou non un plateau selon les conditions expérimentales.



## **Chapitre II : Matériel et méthodes**



## II.1. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

### II.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes retenues dans cette étude sont *Carnobacterium alterfunditum* CIP 105796, *C. divergens* DSM 20623<sup>T</sup>, *C. funditum* CIP 106503, *C. gallinarum* DSM 4847<sup>T</sup>, *C. inhibens* CIP 106869, *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* LMA 28 isolé d'un fromage à pâte molle (Brie), *C. maltaromaticum* « Réo » isolé d'un camembert de Normandie (Réo, Manche, F 50.267.01, CEE), *C. maltaromaticum* « Pérail » provenant d'un fromage Pérail de brebis (Lou Pérac, Aveyron, F 12.225.01, CEE), *C. viridans* CIP 107728, *Enterococcus faecalis* CIP 76117, *Brochothrix thermophacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *Escherichia coli* CIP 54.8, *Desemzia incerta* CIP 104227, *Lb. plantarum* DSM 20174, *Listeria ivanovii* CIP 12510, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, *Pseudomonas fluorescens* CIP 6913, *Lactococcus lactis* DSM 20481, *Streptococcus thermophilus* INRA 302 et le cocktail de souches Flora Danica® (CHR Hansen, Avenue des Baronnes, 34730 Prades-le-Lez, F.).

Les souches sont revivifiées, à partir de cultures lyophilisées ou congelées, par trois repiquages successifs dans un bouillon de culture adéquat et incubées à leur température optimale de croissance. Une banque de souches a été constituée par suspension des cellules lavées en milieu neuf (bouillon Trypcase Soja (TSB) additionné de 6 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (TSB-YE), bouillon d'Elliker ou bouillon MRS) additionné de glycérol (30 % p/v) ; ces bouillons, contenant les cellules bactériennes non cultivées, sont répartis à raison d'un mL par cryotube stérile et conservés à -25 °C. L'entretien des souches est réalisé par deux repiquages successifs en bouillon liquide (TSB-YE, bouillon d'Elliker ou bouillon MRS).

### II.1.2. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes, préalablement stockées à -25 °C, sont décongelées, mises en culture par trois repiquages successifs et incubées à leur température optimale de croissance pendant 16 h. La préculture ainsi obtenue est centrifugée trois fois à 10 000 × g à 4 °C pendant 15 min (Eppendorf, Hambourg, D). A chaque étape, le culot cellulaire est lavé dans de la tryptone-sel (TS) (9,5 g.L<sup>-1</sup>) (Biomérieux, 69280 Marcy-l'Etoile, F). Les culots sont ensuite suspendus dans un volume déterminé de TS afin d'obtenir une

préculture concentrée environ six fois en biomasse par rapport à la préculture avant centrifugation. Un volume d'un mL de cette suspension mère est dilué dans la TS puis est inoculé dans du lait ou dans du TSB-YE en vue de réaliser l'étude physiologique des souches bactériennes.

### **II.1.3. Milieux de culture**

#### **II.1.3.1. Bouillon de laboratoire TSB-YE**

Le bouillon Trypcase Soja (TSB) (Biomérieux) contient, par litre, 3 g de biosoyase (peptone papainique), 17 g de biotrypcase (peptone), 5 g de NaCl, 2,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2,5 g de glucose. Ce bouillon a été modifié par addition de 6 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (YE) (Biokar diagnostics, Beauvais, F) et par substitution ou non de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose par 2,5 ou 5 g.L<sup>-1</sup> de galactose, de lactose, de fructose ou de saccharose (Fischer Scientific Labosi, 78996 Elancourt, F). Les expérimentations ont porté sur des volumes de TSB-YE de 20 mL (tubes à essai à fond rond de 50 mL en verre Pyrex<sup>®</sup>) ou de 150 mL (flacons de 250 mL en verre Pyrex<sup>®</sup>). Les solutions de glucides (10 % p/v) ont été stérilisées par filtration à travers des pores de diamètre 0,22 µm (Fisher) puis ajoutées aseptiquement au bouillon TSB-YE, préalablement autoclavé à 120 °C pendant 15 min.

#### **II.1.3.2. Lait**

Le lait UHT stérilisé demi-écrémé (Scrl Bloc Cvba, B) a été modifié par addition ou non d'extrait de levure (Biokar). Un volume de 18 mL (tubes) ou de 150 mL (flacons) de ce lait est introduit aseptiquement dans des tubes à essais stériles de 50 mL ou dans des flacons stériles de 250 mL, préalablement autoclavés à 120 °C pendant 15 min.

#### **II.1.3.3. Milieux de dénombrement**

Les numérations bactériennes ont été réalisées selon la technique des dilutions décimales en TS. Un volume de 50 µL de la dilution appropriée est déposé à la surface d'une plaque de TSA-YE (TSB-YE gélosé à 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar bactériologique type A, Biokar) à l'aide d'un enseigneur spiral (AES Laboratoire, 35270 Combours, F). Le dénombrement des colonies s'effectue à l'aide d'un compteur automatique (AES Laboratoire).

## II.1.4. Elaboration du milieu sélectif pour *Carnobacterium* sp.

### II.1.4.1. Caractéristiques du milieu

Des milieux de numération pour *Carnobacterium* sp. ont été proposés, mais ces milieux n'ont pas donné totale satisfaction en raison de leur composition et du temps d'incubation jugé trop long pour le suivi de *Carnobacterium* pendant la fabrication fromagère.

La création d'un milieu de numération pour *Carnobacterium* sp. reposait sur un cahier de charge très contraignant : obtention d'un milieu aisé à préparer, limitation du nombre de constituants, transparence et incubation n'excédant pas 48 h sans stockage au froid. Ce milieu sera construit en analysant au préalable le comportement de *Carnobacterium* sp. vis-à-vis de différents antibiotiques, de valeurs de pH basiques (alcalines) et par référence au milieu CTSI. Par rapport à ce milieu, tous les constituants jugés non indispensables ou ayant une action trop fortement inhibitrice seront testés et éventuellement supprimés. Ce milieu sera envisagé pour son utilisation en technologie fromagère, caractérisée par un environnement très diversifié en micro-organismes. Les conditions d'inhibition devront éviter la pousse de la flore fongique. Ce milieu devra en outre empêcher la croissance d'*Enterococcus faecalis*, d'*E. faecium* et d'*E. durans*, espèces phylogénétiquement proches du genre *Carnobacterium* et capables de pousser à des valeurs très élevées de pH (9,6). Ce milieu devra également empêcher le développement de *L. monocytogenes*, espèce psychrotrophe pouvant croître également à des valeurs de pH fortement basiques, qui est très rarement rencontrée dans les fromages.

### II.1.4.2. Antibiogramme

La méthode CA-SFM 2006 (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) a été utilisée afin de déterminer l'antibiogramme des souches phylogénétiquement proches de *Carnobacterium* sp. Les souches *B. thermophacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* LMA 28, *E. faecalis* CIP 76117 et *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> ont été cultivées en bouillon TSB-YE pendant 16 h à leur température optimale de croissance. Après des dilutions décimales en bouillon de Mueller-Hinton (Biorad, Marnes-la-Coquette, F), permettant d'obtenir une population d'environ  $1.10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup>, 10 mL de

ces inoculums ont été déposés sur les plaques de gélose de Mueller-Hinton ou de TSA-YE de 4 mm d'épaisseur ; l'excès d'inoculum a été enlevé après une minute de contact. Trente antibiotiques (Tableau 8), incorporés dans des disques (Biorad), ont été déposés sur ces géloses à raison de quinze disques par boîte à l'aide d'un distributeur de disques (Biorad). Après 18 h d'incubation à 30 ou à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

**Tableau 8 :** Antibiotiques incorporés dans les disques pour antibiogramme\*

Antibiotiques	Concentrations (µg)	Antibiotiques	Concentrations (µg)
Amoxicilline <sup>L</sup>	25	Ciprofloxacine <sup>L</sup>	5
Ticarcilline <sup>L</sup>	75	Péfloxacin <sup>L</sup>	5
Céfalotine <sup>L</sup>	30	Chloramphénicol <sup>L</sup>	30
Céfoxitime <sup>L</sup>	30	Tétracycline <sup>L</sup>	30
Céfotaxime	30	Erythromycine <sup>+</sup>	15
Amoxicilline-acide clavulanique <sup>L</sup>	20/10	Lincomycine <sup>+</sup>	15
Céftazidime <sup>L</sup>	30	Pristinamycine <sup>+</sup>	15
Céfixime <sup>L</sup>	10	Amikacine <sup>L</sup>	30
Pénicilline <sup>L</sup>	6	Nétilmicine <sup>L</sup>	30
Céfapérozone <sup>L</sup>	30	Kanamycine <sup>L</sup>	30
Triméthoprim-sulfamide <sup>L</sup>	1,25/23,75	Gentamicine <sup>L</sup>	15
Triméthoprim <sup>L</sup>	5	Tobramycine <sup>L</sup>	10
Sulfamide <sup>L</sup>	200	Bacitracine <sup>+</sup>	130
Acide nalidixique <sup>-</sup>	30	Fosfomycine <sup>L</sup>	50
Teicoplanine <sup>+</sup>	30	Vancomycine <sup>+</sup>	30

(<sup>L</sup>) : large spectre d'action contre les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives ; (<sup>+</sup>) : inhibe les bactéries Gram-positives ; (<sup>-</sup>) : action dirigée contre les bactéries Gram-négatives ; (\*) : seules les bactéries Gram-positives et Gram-négatives sont concernées.

#### II.1.4.3. pH et températures d'incubation

Le pH basique (> 9,0) est un paramètre important qui empêche ou limite fortement la prolifération de la majorité des espèces bactériennes. Hormis les espèces du genre *Carnobacterium*, il devrait en principe inhiber la croissance de la majorité des bactéries lactiques. Il a été confirmé que les genres *Enterococcus* et *Listeria* sont capables de pousser à de telles valeurs de pH. De plus, l'incubation à 25 °C pendant une durée

relativement courte devrait permettre de sélectionner uniquement les souches psychrotrophes au sein d'une communauté bactérienne complexe contenant majoritairement des bactéries mésophiles.

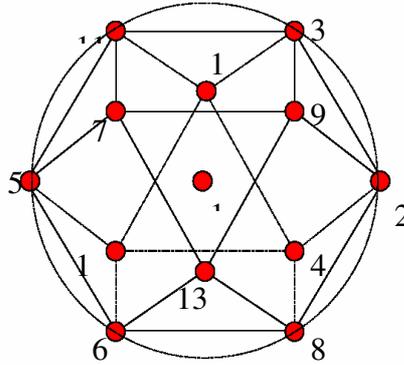
Deux litres de milieu TSA-YE, répartis à raison de 250 mL dans 8 flacons de 500 mL, sont autoclavés à 120 °C pendant 15 min. Les différentes valeurs de pH sont obtenues par addition en conditions aseptiques de volumes déterminés de NaOH 1N au milieu TSA-YE stérile maintenu en surfusion à 52 °C. La gamme de pH est comprise entre 6,8 et 9,4 avec un incrément de 0,3 unité pH. Les souches retenues pour cette étude sont *C. maltaromaticum* LMA 28, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, *E. faecalis* CIP 76117, *Lb. plantarum* DSM 20174 et *Ps. fluorescens* CIP 6913. A partir des dilutions décimales -3, -4 et -5 d'une culture préalable de 24 h, l'ensemencement est réalisé avec un inoculum de 50 µL ; l'incubation est réalisée à 25 °C.

#### **II.1.5. Plans d'expériences selon la matrice de Doehlert**

Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant un nombre raisonnable d'essais. La différence essentielle par rapport à la méthode des cinétiques classiques réside dans la possibilité de varier les niveaux de tous les facteurs à la fois, pour chaque expérience, de manière programmée. Cette approche offre de nombreux avantages tels que la diminution du nombre d'essais, l'augmentation du nombre de facteurs à étudier, la détection d'interactions entre les paramètres. Elle permet également une optimisation, une meilleure précision et une modélisation des résultats. En microbiologie alimentaire, les plans d'expériences sont utilisés afin de prédire le comportement des micro-organismes (croissance, survie ou mortalité) dans un environnement déterminé. Cette technique est fondée sur le développement de modèles mathématiques qui permettent d'établir une relation entre le comportement microbien et les conditions environnementales. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les facteurs à étudier et de délimiter le champ des expérimentations afin d'établir un plan d'expériences adapté à chaque situation. Différents types de plans d'expériences peuvent être utilisés en microbiologie prévisionnelle. Les réseaux uniformes de Doehlert (1970), adoptés pour ce travail, offrent des propriétés et des potentialités d'analyses intéressantes.

### II.1.5.1. Plan de Doehlert à trois facteurs

Ces matrices présentent une distribution uniforme des points expérimentaux dans l'espace des variables codées (Figure 6). Elles sont utiles pour interpoler une réponse ; cette interpolation est toujours de qualité constante puisque le réseau est uniforme.



**Figure 6 :** Distribution des points expérimentaux dans l'espace, selon la matrice de Doehlert, pour trois variables.

La figure engendrée par les 12 sommets est un cuboctaèdre.

Une des caractéristiques importantes des matrices de Doehlert est de permettre une démarche séquentielle dans l'étude car il est possible de construire, autour de l'un des points de la matrice, une nouvelle matrice qui comprend une partie déjà effectuée. Il est aussi possible d'augmenter le nombre de facteurs en cours d'étude sans que la matrice ne perde de sa qualité. Le nombre d'expériences est peu élevé ; le nombre minimal de points distincts ( $N$ ) d'une matrice de Doehlert pour un nombre de facteurs ( $K$ ) donné est  $N \geq K^2 + K + 1$ , avec trois répétitions du point au centre du domaine expérimental. Ainsi, pour  $K = 3$ , le nombre d'expériences à réaliser est de 16 essais.

### II.1.5.2. Analyses statistiques et graphiques

Les analyses de régression multilinéaire et de variance sont réalisées avec le programme REGSA du logiciel Nemrod<sup>®</sup>. Les réponses expérimentales obtenues sont les numérations cellulaires en  $\text{ufc.mL}^{-1}$ , la vitesse maximale d'acidification ( $V_{\text{max}}$ ) en unité  $\text{pH.h}^{-1}$  ou le temps ( $T_{\text{max}}$ ) nécessaire pour atteindre cette vitesse en heure. Chacune de ces réponses peut être représentée par une équation polynomiale du second degré, valable uniquement sur l'ensemble du domaine expérimental, équation traduisant les relations entre les variables

indépendantes ou réponses et les variables dépendantes ou facteurs. Cette équation est composée de 10 coefficients pour trois facteurs.

$$\eta_j = \beta_{j0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ji} X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{jii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{jij} X_i X_j$$

Le paramètre  $\eta_j$  représente les variables dépendantes (réponses),  $x_i$  les variables indépendantes (facteurs),  $\beta_{j0}$  le terme constant,  $\beta_{ji}$  les coefficients linéaires du premier ordre,  $\beta_{jii}$  les termes carrés et  $\beta_{jij}$  les termes d'interaction. Ces coefficients permettent de sélectionner les facteurs les plus influents, de déterminer les interactions entre les facteurs et d'établir les relations entre les réponses et les facteurs. Quand le coefficient est précédé d'un signe positif, le facteur désigné exerce une influence positive sur la réponse (numérations cellulaires en ufc.mL<sup>-1</sup> par exemple). Inversement, quand le coefficient est précédé d'un signe négatif, le facteur désigné exerce une influence négative sur la réponse. La probabilité « p » indique le seuil de signification des facteurs ; sont considérés comme significatifs, les facteurs qui ont une valeur de « p » inférieure ou égale à 0,05.

### II.1.5.3. Méthodologie des surfaces de réponse

Les réponses peuvent être représentées par des courbes d'isoréponses qui permettent de visualiser, à l'intérieur du domaine expérimental, toutes les conditions opératoires aboutissant à une même valeur de réponse. Les courbes d'isoréponses ou d'isopopulations sont définies comme des courbes de niveau de la surface de réponse, telle que la fonction  $y = f(X_i, X_j, \dots, X_k)$  soit égale à une constante. Les graphes sont construits au moyen du logiciel Nemrod<sup>®</sup>, en fonction de deux variables, les autres étant fixées à leur valeur au centre du domaine. La représentation graphique est obtenue en traçant autant de diagrammes qu'il y a de couples possibles  $X_i X_j$ . Lorsqu'une courbe est parallèle à un axe, le paramètre considéré n'exerce aucune influence sur la réponse ; en revanche, quand elle est perpendiculaire à cet axe, le paramètre joue un rôle prépondérant ; lorsqu'elle est oblique, il existe une interaction entre les deux facteurs retenus pour les axes x et y.

### II.1.6. Plan d'expériences incluant les antibiotiques

L'efficacité biocide des antibiotiques dépend de la valeur de pH du milieu. La sélectivité de ce dernier reposant sur une valeur élevée de pH, il s'avère nécessaire de tester l'activité de chacun de ces antibiotiques (vancomycine, gentamicine et acide nalidixique) dans ces conditions. De plus, le plan d'expériences permettra de déterminer les interactions existant entre ces trois antibiotiques.

Des essais ont été réalisés avec les souches *C. maltaromaticum* (LMA 28, DSM 20730<sup>T</sup>, Réo), *C. alterfunditum* CIP 105796, *C. inhibens* CIP 106869, *C. divergens* DSM 20623<sup>T</sup>, *C. gallinarum* DSM 4847<sup>T</sup>, *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup>, *C. viridans* CIP 107728, *C. funditum* CIP 106503, *D. incerta* CIP 104227, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, *E. faecalis* CIP 76117, *Ps. fluorescens* CIP 6913, *E. coli* CIP 54.8 et les souches lactiques du levain Flora Danica<sup>®</sup>. Un plan d'expériences comprenant trois facteurs (vancomycine, gentamicine et acide nalidixique) a été établi selon la matrice de Doehlert, avec la valeur de pH fixée à 8,8 (Tableau 9). L'incubation est réalisée à 25 °C pendant 48 h.

**Tableau 9** : Plan d'expériences établi selon la matrice de Doehlert

Numéros des essais	Vancomycine (mg.L <sup>-1</sup> )	Gentamicine (mg.L <sup>-1</sup> )	Acide nalidixique (mg.L <sup>-1</sup> )
	5 niveaux	7 niveaux	3 niveaux
1	4,5	5,0	20
2	2,5	5,0	20
3	4,0	8,0	20
4	3,0	2,0	20
5	4,0	2,0	20
6	3,0	8,0	20
7	4,0	6,0	40
8	3,0	4,0	0
9	4,0	4,0	0
10	3,5	7,0	0
11	3,0	6,0	40
12	3,5	3,0	40
13	3,5	5,0	20
14	3,5	5,0	20
15	3,5	5,0	20
16	3,5	5,0	20

Vancomycine : 5 niveaux, entre 2,5 et 4,5 mg.L<sup>-1</sup> (incrément de 0,5) ; gentamicine : 7 niveaux, entre 2,0 et 8,0 mg.L<sup>-1</sup> (incrément de 1,0) ; acide nalidixique : 3 niveaux, entre 0 et 40 mg.L<sup>-1</sup> (incrément de 20), pH 8,8

## **II.1.7. Validation du milieu sélectif de numération pour *C. maltaromaticum***

### **II.1.7.1. Vis-à-vis de *C. maltaromaticum* LMA 28**

Les numérations cellulaires sont réalisées en 10 exemplaires à partir de différentes dilutions décimales de *C. maltaromaticum* LMA 28. Les milieux de numération sont le TSA-YE à pH 6,8 (milieu témoin), le TSA-YE à pH 8,8 et le milieu préalablement mis au point, dénommé « milieu pour *Carnobacterium maltaromaticum* » ou MCM. Les incubations sont réalisées à 25 °C pendant 48 h. Les études statistiques portent sur le calcul de la moyenne et des écarts types des numérations bactériennes.

### **II.1.7.2. Vis-à-vis d'un consortium de souches présentes dans l'environnement fromager**

La sélectivité du milieu CM est à nouveau contrôlée, mais en utilisant un cocktail de souches bactériennes. Les souches bactériennes précédemment testées dans le plan d'expériences, souches indésirables ou pathogènes (*E. faecalis* CIP 76117, *Ps. fluorescens*, CIP 106503, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> et *E. coli*, CIP 54.8) et également le levain lactique Flora Danica<sup>®</sup>, sont mélangées. Un volume d'un mL de chaque culture bactérienne en TSA-YE est introduit dans un tube à essais. Les numérations cellulaires initiales de chacune de ces cultures mères sont réalisées. A ce cocktail de souches est ajouté soit un mL d'une suspension mère de *C. maltaromaticum* LMA 28 en TS (cocktail +), soit un mL d'eau distillée stérile (cocktail -). Les dénombrements bactériens de ces deux mélanges de souches sont effectués sur milieu TSA-YE à pH 6,8 et à pH 8,8 et également sur le milieu CM à l'aide d'un ensemenceur spiral, par dépôt de 50 µL d'inoculum bactérien. Les incubations sont réalisées à 25 °C pendant 48 h.

## **II.1.8. Cinétiques d'acidification de quatre souches de *C. maltaromaticum* (LMA 28 « Pérail », « Réo » et DSM 20730<sup>T</sup>), de *Lc. lactis* DSM 20481 et de *S. thermophilus* INRA 302 en culture pure**

Les glucides retenus dans ces essais sont le lactose, et ses deux constituants, le glucose et le galactose, ainsi que le fructose, présent dans des produits laitiers fermentés par ajout de fruits, et/ou le saccharose, par sucrage. La cinétique d'acidification exprimée par la variation du pH en fonction du temps, a été caractérisée par la vitesse maximale

d'acidification ( $V_{\max}$ ), le temps ( $T_{\max}$ ) et le pH ( $\text{pH}_{\max}$ ) correspondant à  $V_{\max}$  (Corrieu *et al.*, 1988).

#### **II.1.8.1. En TSB-YE**

Les cultures bactériennes de *C. maltaromaticum* LMA 28, préadaptées au glucose ou au lactose ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), sont inoculées de façon indépendante dans 150 mL de TSB-YE, modifié par substitution ou non du glucose, à un niveau de population initiale d'environ  $1.10^3 \text{ ufc.mL}^{-1}$ , puis sont incubées à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les cultures sont effectuées en statique dans un bain d'eau thermostaté (Fischer), afin de suivre l'acidification à l'aide d'un multimètre enregistreur (conductimètre Consort D230, 92200, Neuilly-sur-Seine, F). Les numérations bactériennes ont été réalisées uniquement en début et après 50 h d'incubation.

#### **II.1.8.2. En lait**

Les cultures bactériennes de *C. maltaromaticum* LMA 28, de *Lc. lactis* DSM 20481 et de *S. thermophilus* INRA 302, sont inoculées de façon indépendante dans 150 mL de lait supplémenté ou non avec 1 à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure, à un niveau de population initiale d'environ  $1.10^3 \text{ ufc.mL}^{-1}$ , puis sont incubées à  $30$  ou à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  selon leur température optimale de croissance. Les expérimentations (numération cellulaire, acidification) ont été conduites comme précédemment.

#### **II.1.9. Cinétique d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en co-culture avec *Lc. lactis* DSM 20481 ou avec *S. thermophilus* INRA 302 dans du lait**

Les levains lactiques utilisés en technologie laitière sont généralement constitués d'un mélange complexe de bactéries lactiques possédant des profils d'acidification différents. Afin d'étudier le comportement de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans un cocktail de bactéries lactiques, sa cinétique d'acidification a été étudiée en co-culture avec *Lc. lactis* DSM 20481 ou avec *S. thermophilus* INRA 302. Les cultures bactériennes sont inoculées dans du lait supplémenté avec  $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure, puis sont incubées à  $30$ ,  $34,5$  et à  $39 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les expérimentations (numération cellulaire, acidification) ont été conduites comme précédemment (cf. II.1.8.1).

### II.1.10. Impact de la combinaison pH-température sur la cinétique d'acidification du lait par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302 (plan d'expériences)

En fabrication fromagère, lors des différentes étapes de coagulation, égouttage, affinage, puis stockage, le pH et la température du lait et du caillé varient dans des gammes relativement larges. La technologie traditionnelle de fromage à pâte molle utilise essentiellement *Lc. lactis* inoculé dans du lait de fabrication à des températures entre 31 et 35 °C. Une nouvelle technologie, pour la fabrication de certaines spécialités fromagères à pâte molle, dite « thermophile » utilise *S. thermophilus* dans du lait emprésuré à 39 °C. L'objectif est d'étudier le comportement de *C. maltaromaticum* dans une gamme de températures variant entre 39 °C (technologie « thermophile ») et 3 °C (stockage des fromages en réfrigération) et dans une gamme de pH entre 5,2 (acidité au démoulage) et 8,0 (fromage très affiné). Deux plans d'expériences ont ainsi été réalisés, un « températures chaudes » entre 23 et 37 °C avec un incrément de 7 °C, l'autre « températures froides », entre 3 et 23 °C avec également un incrément de 7 °C. Ces deux plans possèdent donc la température de 23 °C en commun. Ces trois espèces bactériennes auront des comportements différents selon la température, « thermophile » pour *S. thermophilus*, « mésophile » pour *Lc. lactis* et « psychrotrophe » pour *C. maltaromaticum*. Ainsi, *C. maltaromaticum* pourrait se montrer opérationnel sur la totalité des deux gammes de températures et de pH.

L'impact de la combinaison pH initial du lait et température d'incubation, sur la croissance bactérienne, a été étudié à l'aide d'une matrice expérimentale (Tableaux 10 et 11). Les valeurs initiales du pH du lait, entre 5,2 et 8,0, ont été ajustées aseptiquement avec ajout de NaOH 1N ou d'acide lactique L(+) 10 N (Sigma-Aldrich Chimie S.A.R.L. l'Isle d'Abeu-Chesnes, 38297 St.-Quentin-Fallavier, F). Les souches *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302 ont été inoculées dans du lait supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, à un niveau de population initiale d'environ 1.10<sup>3</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>. Les cultures sont effectuées en statique dans un bain d'eau thermostaté (Fisher) entre 3 et 37 °C, afin de suivre l'acidification. Les numérations bactériennes ont été réalisées uniquement en début et en fin d'incubation.

**Tableau 10** : Plan d'expériences à deux facteurs, pH initial du lait et température d'incubation, « températures chaudes »

N° Expériences	pH	Températures (°C)
1	8,0	30
2	5,2	30
3	7,3	37
4	5,9	23
5	7,3	23
6	5,9	37
7	6,6	30
8	6,6	30

**Tableau 11** : Plan d'expériences à deux facteurs, pH initial du lait et température d'incubation, « températures froides »

N° Expériences	pH	Températures °C
1	8,0	23
2	5,2	13
3	7,3	23
4	5,9	3
5	7,3	3
6	5,9	23
7	6,6	13
8	6,6	13

### II.1.11. Recherche de bactériocines produites par *C. maltaromaticum* LMA 28

#### II.1.11.1. Méthode de détection en milieu solide

Le spectre antibactérien de *C. maltaromaticum* LMA 28 a été établi en testant son surnageant de culture contre *S. thermophilus* INRA 302, *Lc. Lactis* DSM 20481, *L. ivanovii* CIP 12510 et *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, selon la méthode antibiogramme en milieu solide. Le surnageant de culture a été préparé de la manière suivante : 1 mL d'une culture bactérienne de *C. maltaromaticum* LMA 28 de 15 h à 30 °C en TSB-YE a été prélevé puis centrifugé pendant 5 min à 5000 x g afin d'éliminer les cellules bactériennes. Un volume d'un mL de surnageant a été transféré dans un microtube (Fischer) et chauffé à 70 °C pendant 15 min afin de détruire les cellules bactériennes.

Un volume de 12 mL de TSA-YE, supplémenté avec du Tween 80 (Merck, 94736 Nogent-sur Marne, F) à 1 % (p/v) préalablement stérilisé, est ensemencé avec 0,1 mL de la dilution -2 d'une culture fraîche de la souche cible puis est coulé en boîte de Petri. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose à l'aide d'une cloche de Durham. Des volumes de 25 µL des échantillons de surnageant de culture de *C. maltaromaticum* LMA 28 sont déposés dans chaque puits. Les géloses sont ensuite placées à 4 °C pendant 15 h afin de permettre la diffusion des agents antibactériens, puis sont incubées pendant 8 à 30 h à la température optimale de croissance de la souche cible. A la fin de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en soustrayant le diamètre du puits.

### **II.1.12. Analyse bactériologique des fromages**

Un échantillon de fromage (10 g) a été introduit dans 90 mL de tampon citrate trisodique (0,5 M, pH 7,0 ; Labosi, Oulchy-Le-Château, F). Après traitement pendant 3 min au stomacher, à température ambiante cette suspension (+1) a été soumise à des dilutions décimales successives en TS. Les milieux de dénombrement retenus sont le TSA-YE (pH 6,8) et le milieu CM, respectivement pour les numérations de la flore lactique totale et de *C. maltaromaticum* LMA 28. Selon la charge microbienne initiale du lait, différentes stratégies expérimentales ont été retenues. Pour les essais, les plus chargés en *C. maltaromaticum* LMA 28, l'ensemencement de la surface de la gélose a été réalisé avec l'ensemenceur spiral par dépôt de 50 µL d'inoculum d'une dilution décimale appropriée. En revanche pour les essais, les moins chargés en *C. maltaromaticum* LMA 28, la suspension (+1) a été déposée par inclusion (1 mL) dans les milieux de numération appropriées. L'ensemencement est réalisé dans 10 boîtes de Petri et la numération cellulaire, considérée pour un gramme de fromage, correspond à la somme des numérations bactériennes des 10 plaques de gélose. Un volume de 10 mL de cette suspension (+1) a également servi à un test de pré-enrichissement dans 90 mL de bouillon CM.

## II.2. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

### II.2.1. Profil carboné de *C. maltaromaticum* (LMA 28, « Réo », « Pérail » et DSM 20730<sup>T</sup>) sur galeries API 50 CHL

La détermination de la capacité de quatre souches de *C. maltaromaticum* (LMA 28, « Réo », « Pérail » et DSM 20730<sup>T</sup>) à hydrolyser ou à fermenter des glucides plus ou moins complexes a été réalisée sur galeries API 50 CHL (Biomérieux). Ce système standardisé, comprenant 49 tests biochimiques, permet l'étude du métabolisme des glucides par des micro-organismes. Il a été mis au point pour l'identification des lactobacilles. Les inoculums sont réalisés à partir de colonies prélevées sur plaques de TSA-YE, préalablementensemencées chacune avec une préculture de 15 h en TSB-YE. La concentration de chaque suspension cellulaire a été ajustée à la valeur 2 de l'échelle de McFarland. Le milieu API 50 CHL, ensemencé avec l'une des quatre souches, est uniformément réparti dans les 49 cupules ; les cultures sont recouvertes d'huile de paraffine (Merck). La lecture est réalisée après 24, 48 et 72 h d'incubation à 30 °C ; seuls les résultats obtenus à 24 h ont été exploités.

### II.2.2. Dosages du glucose, du galactose, du fructose, du lactose, de l'acide lactique et de l'éthanol en milieu TSB-YE

#### II.2.2.1. A l'aide de kits enzymatiques

A partir de cultures bactériennes de *C. maltaromaticum* LMA 28 et de *S. thermophilus* INRA 302 en TSB-YE modifié par substitution de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose par 5 g.L<sup>-1</sup> de lactose, de fructose, de galactose et de glucose, les prélèvements (10 mL) sont effectués toutes les 5 h pendant 25 h. Ces échantillons sont ensuite stérilisés par filtration sur des filtres de diamètre de pores de 0,22 µm puis sont introduits dans des microtubes de 1,5 mL (Fischer) et stockés à -25 °C jusqu'à leur analyse.

La détermination de la concentration en glucides a été réalisée à l'aide de kits de dosages enzymatiques (Biosentec, 31077 Toulouse Cedex, F) à 340 nm (Spectrophotomètre UV 160 A, Shimadzu, Kyoto, J). Les échantillons sont décongelés à température ambiante

pendant 1 h, dilués au 10<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée stérile, puis ajustés avec NaOH 1 N à une valeur de pH entre 8 et 9. La  $\beta$ -galactosidase et la D-galactose-déshydrogénase permettent respectivement le dosage du lactose et du galactose, la D-glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la phosphoglucoisomérase et la  $\beta$ -fructosidase ceux du glucose et du fructose, la L-lactate déshydrogénase, la D-lactate déshydrogénase et la glutamate-pyruvate transaminase, les déterminations des isomères optiques L(+) et D(-) de l'acide lactique.

### **II.2.2.2. Par chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

L'identification et la quantification des glucides et de l'acide lactique ont été effectuées par chromatographie liquide haute performance (HPLC), à l'aide d'un système Bio-Rad (Bio-Rad Laboratoires, 92430 Marne-la-Coquette, F). Le système est équipé d'une pré-colonne cation H<sup>+</sup> (Bio-Rad) et d'une colonne polypore H<sup>+</sup> (250 mm x 7 mm, Bronnlee labs). La phase mobile, utilisée à un débit de 0,9 mL.min<sup>-1</sup>, est une solution d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,04 N.

Un détecteur UV (Waters 484, Waters, B.P 608, 78056, St-Quentin en-Yvelines, F), a été ajusté à 210 nm, afin de doser l'acide lactique. Un moniteur à indice de réfraction (Bio-Rad) a dosé le lactose, le glucose, le fructose et le galactose. Des courbes étalons, variant de 0,5 à 10 g.L<sup>-1</sup>, ont été réalisées pour les dosages des glucides et de l'acide lactique. Une solution mère en eau distillée déionisée, contenant chacun des constituants, a été réalisée à une concentration de 10 g.L<sup>-1</sup>.

### **II.2.3. Profils enzymatiques de *C. maltaromaticum* (LMA 28 « Réo » « Pérail » et DSM 20730<sup>T</sup>), de *Lc. lactis* DSM 20481 et de *S. thermophilus* INRA 302**

#### **II.2.3.1. Sur galerie API ZYM**

Les activités enzymatiques de quatre souches de *C. maltaromaticum* (LMA 28, « Réo », « Pérail », DSM 20730<sup>T</sup>), *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302 ont été observées à l'aide de galeries API ZYM (BioMérieux). Les suspensions cellulaires ont été réalisées dans 2 mL du milieu préconisé, à partir de colonies de 48 h prélevées aseptiquement à la surface d'une plaque de TSA-YE, préalablement ensemencée avec une préculture de 15 h en TSB-YE. La densité de la suspension, comprise entre 5-6 de l'échelle

de McFarland, est mesurée à l'aide du Densimat<sup>®</sup> (BioMérieux). Dans chaque cupule de la galerie sont introduits aseptiquement 65 µL d'inoculum. La galerie est ensuite incubée pendant 4 h à 37 °C puis les résultats sont révélés par l'ajout dans chaque cupule des réactifs ZYM A et ZYM B. L'activité enzymatique est ensuite quantifiée par comparaison de la coloration apparue dans les puits avec un nuancier. Les résultats, exprimés en nmoles de substrat, varient entre 5 et 40 nmoles.

### II.2.3.2. Sur milieux gélosés spécifiques

Les activités lipasique et protéolytique de *C. maltaromaticum* LMA 28 ont été comparées avec celles de souches lactiques, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302 et avec celles de souches de contamination *E. faecalis* CIP 76117 et *Ps. fluorescens* CIP 6913, espèces éventuellement présentes dans du lait cru ou des fromages au lait cru.

#### \* Activité lipolytique

La mise en évidence d'une activité lipolytique a été effectuée sur le milieu au bleu de Nil dont la composition par litre est : 10 g de peptone (Biokar), 5 g d'extrait de viande (Biokar), 5 g de NaCl (Fischer), 100 mL de sulfate au bleu de Nil à 0,1 % (p/v) (Merck), 15 g de gélose (Biokar) et 900 ml d'eau distillée. Ces ingrédients, mélangés et dissous par chauffage, sont ensuite répartis à raison de 15 mL par tube et autoclavés à 115 °C pendant 20 min. L'émulsion de matière grasse est obtenue en mélangeant 50 mL de surnageant de beurre fondu (Scrl) avec de l'eau distillée à 60 °C et 1 mL de Tween 20 (Merck). Le mélange est mixé (Moulinex, 69131 Ecully Cedex, F) pendant 3 min puis est distribué dans des tubes à raison de 5 mL par tube et stérilisé à 120 °C pendant 20 min. Pour l'emploi, 15 mL de milieu sont ajoutés à 2,5 mL d'émulsion de matière grasse ; le mélange est homogénéisé et coulé en boîtes de Petri à la température de 50 °C.

L'ensemencement de la gélose au bleu de Nil est réalisé à l'aide d'un fil droit de platine, préalablement trempé dans une culture bactérienne de 15 h en TSB-YE. L'hydrolyse de la matière grasse se traduit par une coloration qui vire du bleu à la couleur orange autour de la zone de la piqûre. La mesure des diamètres des zones d'hydrolyse permet d'évaluer et de comparer l'activité lipasique de ces cinq souches. Les essais ont été réalisés en triple.

### \* Activité protéolytique

L'évaluation qualitative de l'activité protéolytique (activité caséinolytique) des cinq souches testées a été réalisée sur gélose double au lait. Lorsque la caséine du milieu gélosé opaque est dégradée en fractions azotées solubles, les diamètres des zones translucides de protéolyse sont mesurés.

Le milieu gélose au lait est constitué de 100 mL de lait UHT écrémé stérilisé (Lactel, 53093 Laval Cedex, F) et de 100 mL de gélose double (Biokar) à 3 % (p/v) stérilisée à 120 °C pendant 15 min. Les deux volumes sont mélangés aseptiquement à 50 °C. Après homogénéisation douce afin d'éviter la formation des bulles d'air, le mélange est coulé en boîtes de Petri. L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale sur le milieu gélosé à l'aide d'un fil droit de platine préalablement plongé dans une culture de 15 h en TSB-YE. Les essais ont été réalisés en triple.

### II.2.3.3. Recherche de l'activité $\beta$ -galactosidasique

L'hydrolyse du lactose par *C. maltaromaticum* LMA 28 a été recherchée par le test à l'ortho-nitro-phényl-galactopyranoside (ONPG). Les bactéries acidifiant le lactose doivent posséder deux enzymes :

- une  $\beta$ -galactoside perméase nécessaire à la pénétration du lactose à l'intérieur de la bactérie ;
- une  $\beta$ -galactosidase permettant de scinder la molécule de lactose en glucose et galactose.

En absence de la première enzyme, une bactérie  $\beta$ -galactosidase-positif ne pourra pas exprimer son caractère lactose-positif. Le test à l'ONPG permet de détecter l'expression de cette enzyme ; l'hydrolyse de l'ONPG par la  $\beta$ -galactosidase libère l'ortho-nitrophénol, composé coloré en jaune.

Le test est réalisé à partir d'un isolat de *C. maltaromaticum* LMA 28 prélevé du milieu TSB-YE contenant du lactose. Une suspension dense de cet isolat dans 0,5 mL d'eau déminéralisée stérile est réalisée dans un tube à hémolyse. Après homogénéisation, un

disque d'ONPG est placé dans le tube contenant la suspension. L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 30 min.

#### **II.2.4. Production de composés aromatiques par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302**

Un volume de 18 mL de lait UHT stérilisé demi-écrémé est introduit aseptiquement dans des tubes à essais de 50 mL, préalablement stérilisés à 120 °C pendant 15 min. L'ajout des précurseurs d'arôme (leucine, isoleucine et valine, 2 mM, pyridoxal-5-phosphate, 2 mM et acide  $\alpha$ -céto-glutarique, 10 mM) (Sigma-Aldrich) a été effectué à l'aide de solutions mères de 100 mM préalablement stérilisées par filtration sur des pores de 0,22  $\mu$ m de diamètre (Fischer). Le pH des laits additionnés avec les précurseurs d'arôme a été neutralisé ou non à 7,0 avec NaOH 1 N. Ces laits ont été incubés dans une étuve à 30 ou à 37 °C. Des prélèvements de 5 mL d'échantillons de lait ont été effectués toutes les 5 h pendant 25 h afin de quantifier la production de composés aromatiques, déterminer la croissance bactérienne et noter la valeur du pH.

##### **II.2.4.1. Dosage de composés aromatiques**

Les échantillons de lait fermenté ont été préparés dans des vials en verre de 10 mL, à raison d'1 mL d'échantillon par vial. Les vials étaient scellés par des capsules à sertir (Fischer) et les échantillons étaient congelés à -25 °C jusqu'au moment de l'analyse. Lors de l'analyse, les vials congelés étaient placés sur le passeur de l'espace de tête.

L'analyse des différents composés volatils (3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal et 2-méthylpropanal) (Sigma) a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le chromatographe utilisé (PR 2100, Périchrom, Zac-du-Moulin, 91160 Saulx-lès-Chartreux, F) était équipé d'un injecteur à espace de tête (Headspace HT 300A Périchrom) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID, Périchrom). Les composés volatils ont été séparés à l'aide d'une colonne capillaire de 30 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu$ m et dosés grâce à l'intégrateur WINILAB III (Périchrom). Le gaz vecteur était de l'azote sous un débit constant de 2,0 mL.min<sup>-1</sup>. Les températures du détecteur et du port d'injection étaient maintenues à 250 °C. L'ajustement de la quantité de produit, par la vanne de fuite ouverte ou le « split », était de 1 :10. Le programme du four s'établissait comme suit : 40 °C pendant 5 min, 4 °C

par min jusqu'à 240 °C et 5 min à 240 °C. Pour l'injecteur de l'espace de tête, la température du four était de 90 °C. Les échantillons étaient maintenus dans le four pendant 2 min avant leur injection. Les vials étaient pressurisés pendant 30 s et l'injection durait 15 s.

Des courbes étalons ont été réalisées avec le 3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal et le 2-méthylpropanal (Sigma), pour des concentrations variant entre 1 et 100 µM.

### **II.2.5. Dosage des amines biogènes**

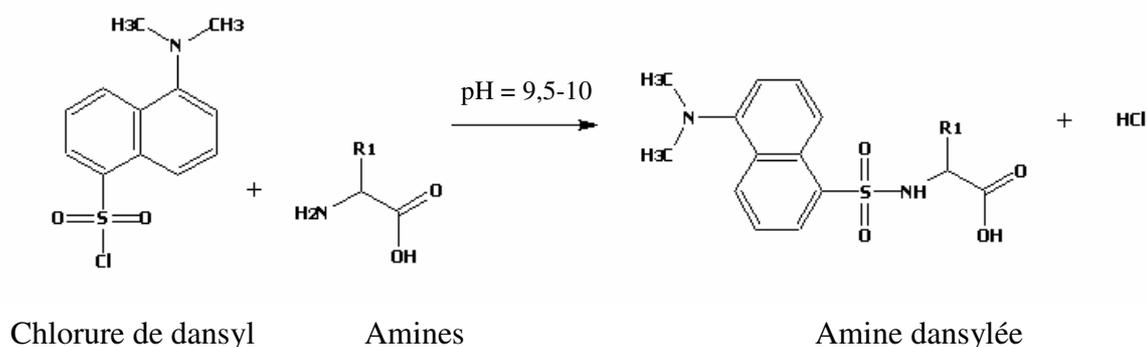
La tyramine et l'histamine ont été dosées par HPLC selon la méthode décrite par Eerola *et al.* (1993) qui comprend une étape de dansylation suivie de leur séparation par chromatographie sur colonne en polarité de phase inverse. Le chlorure de dansyl (chlorure de 5-diméthylamino-naphthalène-1-sulfonyl) réagit, en milieu alcalin, avec le groupement NH<sub>2</sub> des amines (Figure 7). Le composé dansylé obtenu peut alors être détecté à 254 nm par absorbance de la liaison formée entre le composé aminé et le chlorure de dansyl.

#### **II.2.5.1. Dansylation**

Une gamme étalon d'amines (histamine, tyramine) (Sigma), contenant de 0,5 à 100 µg.mL<sup>-1</sup> de chaque amine a été préparée. Un volume de 300 µL de gamme étalon, de surnageant de culture ou de fromage extrait dans l'acide perchlorique 0,4 M sont dansylés en ajoutant dans l'ordre : 100 µL de NaOH 2 N, 150 µL d'une solution de bicarbonate de sodium à saturation et 1 mL de chlorure de dansyl (Sigma) à 10 mg.mL<sup>-1</sup>, préparé extemporanément dans l'acétone. Le mélange est placé dans un bain d'eau à l'abri de la lumière, à 40 °C pendant 45 min. Un volume de 50 µL d'ammoniaque pur est ensuite ajouté afin d'éliminer l'excès de chlorure de dansyl. Après 30 min à l'obscurité, 700 µL d'acétonitrile sont ajoutés puis le mélange est centrifugé pendant 5 min à 4000 × g. Les surnageants obtenus peuvent être conservés 2 jours à température ambiante ou pendant 6 mois à -20 °C.

### II.2.5.2. Dosage par HPLC

Les amines dansylées sont analysées par HPLC sur une colonne Equisorb C18 ODS2 (4,6 × 250 mm, 5 µm) thermostatée à 40 °C et surmontée d'une précolonne C18 Millipore Waters. La colonne est équilibrée avec un mélange de 45 % d'acétate d'ammonium 0,1M (éluant A) et 55 % d'acétonitrile (éluant B). Un volume de 20 µL d'échantillon ou de gamme étalon est injecté manuellement en tête de colonne. Les amines sont ensuite éluées par un mélange éluant A/éluant B en augmentant la concentration en éluant B de 55 à 90 % pendant 18 min sous un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La durée totale d'analyse, avec le retour aux proportions de départ (45 % d'éluant A/55 % d'éluant B) et l'équilibration de la colonne, est de 28 min. Les amines dansylées sont détectées à 254 nm et quantifiées par intégration de la surface de leur pic par rapport à la courbe de calibration d'amines à l'aide du logiciel Borwin (JMBS développement, 38600 Fontaine, F).



**Figure 7** : Réaction de dansylation des amines

## II.3. TECHNIQUES RHEOLOGIQUES

### II.3.1. Détermination de paramètres rhéologiques de laits acidifiés par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302

La texture d'un produit laitier fermenté constitue une propriété sensorielle importante qui détermine l'acceptabilité et la préférence du produit par le consommateur. Afin de caractériser le caillé lactique obtenu avec *C. maltaromaticum* LMA 28 et de le comparer avec ceux de *Lc. lactis* DSM 20481 et de *S. thermophilus* INRA 302, des paramètres rhéologiques des différents gels lactiques ont été déterminés.

La technique en mode oscillatoire a été utilisée afin de suivre la transition sol-gel de lait UHT stérilisé demi-écrémé,ensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. Lactis* DSM 20481 ou *S. thermophilus* INRA 302.

Les mesures d'oscillations dynamiques ont été réalisées avec un rhéomètre à contrainte imposée, Rheologica Stresstech (Reologica Instruments AB, Suède), équipé d'une géométrie plan-plan strié et piloté par un logiciel d'oscillation permettant de travailler en mode de déformation fixée. Le plan strié utilisé avait un diamètre de 3 cm. Le rhéomètre était relié à un bain d'eau thermostaté permettant de réguler la température du plan du rhéomètre.

Le programme d'oscillation à déformation contrôlée est fondé sur l'application d'une contrainte variable et sur la mesure de la déformation avec son angle de déphasage. La contrainte nécessaire pour déformer l'échantillon à la valeur imposée est régulée suivant les données obtenues. Cette contrainte sera augmentée ou réduite jusqu'à ce que la valeur de la déformation imposée soit atteinte. Celle-ci a été fixée à 2 % afin de rester dans la région de viscoélasticité linéaire ; la fréquence est de 0,159 Hz (Kim et Kinsella, 1989).

Deux séries de flacons, contenant chacun 150 mL de lait UHT demi-écrémé stérilisé supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (Biokar) et ensemencés de façon identique, étaient utilisées pour cette étude. Une série permettait le suivi en continu de l'acidification du lait à l'aide du multimètre enregistreur (Consort) et l'autre série permettaient de suivre l'augmentation de la population bactérienne et la variation de paramètres rhéologiques.

Afin d'étudier la variation des paramètres rhéologiques du lait au cours de l'acidification, un volume de 0,7 mL de lait (imposé par la géométrie du plan strié utilisé) était prélevé et déposé sur le plan du rhéomètre thermostaté à 30 ou à 37 °C pendant 48 h. Les variations du module de conservation G', qui exprime l'élasticité du gel, et du module de perte G'', qui est représentatif de sa viscosité, étaient mesurées au cours du temps (Kristo *et al.*, 2003).

## II.4. EVALUATION SENSORIELLE

L'analyse sensorielle est un outil indispensable pour le contrôle de la qualité des produits alimentaires. Elle repose sur la dégustation des produits et sur l'analyse statistique des réponses sensorielles données par les dégustateurs. L'évaluation sensorielle des fromages nécessite la mise en place d'un groupe de sujets motivés, entraînés à reconnaître les différentes saveurs caractéristiques et à mesurer leur intensité. Pour ce faire, la sélection des membres du jury a été réalisée selon la directive des normes internationales (AFNOR V09 003) ; elle a été précédée par une phase d'entraînement du jury qui permettait d'habituer les sujets aux produits et de les initier à la perception d'odeurs et de saveurs caractéristiques en relation avec différents produits laitiers.

### II.4.1. Préparation des solutions

Les cinq saveurs fondamentales, ainsi que la saveur maltée, ont été retenues pour cette étude. Les solutions ont été préparées dans de l'eau minérale (Evian<sup>®</sup>, F). La saveur sucrée a été obtenue par la dissolution de 5,76 g.L<sup>-1</sup> de saccharose (PRS, Pancreac quimica, Barcelona E.), la saveur amère grâce à une concentration de 0,015 g.L<sup>-1</sup> de sulfate de quinine (Sigma), la saveur acide par ajout de 0,43 g.L<sup>-1</sup> d'acide citrique (Fisher), la saveur salée par addition de 1,19 g.L<sup>-1</sup> de chlorure de sodium (Sigma), la saveur umami par ajout de 0,6 g.L<sup>-1</sup> d'acide glutamique (Sigma) et la saveur maltée par la préparation d'une suspension de 3 g.L<sup>-1</sup> de Tonimalt<sup>®</sup> (Nestlé<sup>®</sup>, Marne-la-vallée, F). Un volume de 20 mL de chaque solution était prélevé et introduit dans des verres en matière plastique transparente à usage unique ; ces échantillons étaient ensuite codés et présentés au jury.

Les odeurs de référence, ammoniacque, beurre, crème, vomit, rance, moisi, champignon et styrène ont été sélectionnées dans l'aromatèque de fromages (Institut Technique Français des Fromages, Technopole alimentec, Bourg-en-Bresse, F). Chaque échantillon était codé et présenté au juge.

## **II.4.2. Entraînement du jury**

La séance d'évaluation sensorielle a été organisée en milieu de matinée (10 h) afin d'obtenir la meilleure sensibilité des dégustateurs ; elle a duré 45 min. Afin de conserver une sensibilité constante, les dégustateurs se rinçaient la bouche avec soin avec de l'eau minérale (Evian<sup>®</sup>), en début de séance et après chaque absorption d'échantillon. L'objectif consistait à relier le descripteur à l'échantillon proposé, préalablement codé.

## **II.5. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **II.5.1. Extraction de l'ADN bactérien**

#### **II.5.1.1. A partir d'une colonie**

L'ADN bactérien est extrait à partir d'une colonie prélevée sur plaque de gélose, selon le protocole de Yost et Nattress (2000). La colonie est mise en suspension dans 50 µL d'eau distillée déionisée (Easypure, RF, Fischer). La suspension est portée à 100 °C pendant 5 min dans un bain à sec (FALC Instruments s.r.l., Treviglio, I). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 8000 x g pendant 3 min (centrifugeuse, Eppendorf) ; un volume de 10 µL du surnageant, qui contient l'ADN, est utilisé pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), (Thermocycleur icycler, Biorad).

#### **II.5.1.2. A partir d'un bouillon de culture**

L'ADN bactérien est également extrait selon les méthodes de Yost et Nattress (2000) et de Sambrook *et al.* (1989). Après culture de la souche pendant 15 h, le culot cellulaire est récupéré par centrifugation d'un mL de culture (8000 x g pendant 3 min), lavé deux fois dans de l'eau physiologique (1 mL) puis mis en suspension dans 50 µL d'eau stérile ultra-pure (Easypure). La suspension bactérienne est alors chauffée à 100 °C pendant 5 min dans un bain à sec (FALC Instruments) puis centrifugée (8000 x g pendant 3 min) afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules non lysées. Le surnageant est ensuite prélevé délicatement et conservé à -25 °C jusqu'à son utilisation pour les réactions de PCR.

### II.5.1.3. A partir du fromage

Une masse de fromage de 10 g est mise en suspension dans 9 fois son volume en tampon citrate 0,5 M, pH 7,0 et homogénéisé au stomacher (Interscience, St-Nom-la-Bretèche, F) afin de réaliser une suspension mère correspondant à la dilution -1. Une série de dilutions décimales de cette suspension mère est effectuée dans de l'eau physiologique. Un volume de 1 mL de la dilution -4 est centrifugé à 8000 x g pendant 3 min. Le culot est mis en suspension dans 100 µL d'eau distillée déionisée (Easypure), puis porté à 100 °C pendant 5 min dans un bain à sec (FALC Instruments). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 8000 x g pendant 3 min ; un volume de 10 µL du surnageant est utilisé pour la PCR.

### II.5.2. Amplification par PCR avec les amorces spécifiques de genre Cb1/Cb2R et d'espèce Cpis/23S-7 : identification génotypique de *C. maltaromaticum* LMA 28

Le milieu réactionnel de la PCR est constitué de 25 µL de kit PCR 2x Goldstar Master Mix (Eurogentec, Seraing, B), de 1 µL de chaque amorce (Tableau 12), de 10 µL d'ADN bactérien et de 13 µL d'eau distillée déionisée (Easypure), réalisant ainsi un volume réactionnel final de 50 µL. La réaction d'amplification est effectuée dans un thermocycler (Biorad) ; elle consiste en une incubation à 94 °C pendant 3 min, 35 cycles de trois étapes comprenant 45 s de dénaturation à 94 °C, 45 s d'hybridation à 55 °C et 40 s d'extension à 72 °C, suivie d'une extension finale de 7 min à 72 °C.

**Tableau 12 :** séquence des amorces pour des PCR avec *Carnobacterium* sp.

amorces	Séquences (5' → 3')	Cibles	Localisation	Tm °C	références
<b>23S-7</b>	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC	ARNr 23S	189-207	56	Kabadjova <i>et al.</i> , 2002
<b>Cb 1</b>	CCGTCAGGGGATGAGCAGTTAC	ARNr 16S	477-499	55	Nissen <i>et al.</i> , 1994 Connil <i>et al.</i> , 1998 Yost et Natress, 2000 Kabadjova <i>et al.</i> , 2002 Scarpellini <i>et al.</i> , 2002
<b>Cb2R</b>	ACATTCGAAACGGATGCTAAT	ARNr 16S	155-174	55	Nissen <i>et al.</i> , 1994 Yost et Natress, 2000 Scarpellini <i>et al.</i> , 2002
<b>Cpis</b>	TTTATTTTTAATTAATACCC	ARNr 16S-23S	193-213	53	Rachman <i>et al.</i> , 2004

### **II.5.3. Recherche de *C. maltaromaticum* dans 30 fromages français**

Trente fromages français ont été achetés dans le commerce en octobre 2004 et en avril 2005 (Tableau 13) afin de rechercher *Carnobacterium* sp. Sa présence est mise en évidence par la réaction de PCR à l'aide d'amorce Cpis/23S-7 décrite précédemment, avec et sans étape de pré-enrichissement réalisé à l'aide du bouillon sélectif de numération CM (cf.II.1.12).

**Tableau 13** : Les 30 fromages français à pâte molle choisis pour la recherche de *Carnobacterium* sp.

N°	Fromages	Marques	Origine du lait	Département et code de l'usine
1	Pérail	Lou Pérac	Lait de brebis pasteurisé	Aveyron F 12,225,01 CEE
2	Margalet	Monbrenac	Lait de brebis pasteurisé	Aveyron F 12,299,20 CEE
3	Brique de Jussac	Jussac	Lait cru de brebis	Haute-Loire F 43,162,02 CEE
4	Rocamadour*	Patrimoine gourmand	Lait cru de chèvre	Lot F 46,177,01 CEE
5	Crottin de Chavignol*	Cora	Lait cru de chèvre	Cher F 18,194,50 CEE
6	Cavet	Fermier	Lait cru de chèvre	Drôme F 26,114,01 CEE
7	Picodon*	Rians	Lait cru de chèvre	Drôme F 26,011,01 CEE
8	Le Chèvre de caractère	Soignon	Lait cru de chèvre	Vienne F 86,092,01 CEE
9	Sainte Maure*	Soignon	Lait cru de chèvre	Deux-Sèvres F 79,276,01 CEE
10	Coulommiers	Cora	Lait de vache pasteurisé	Ille et Vilaine F 35,239,01 CEE
11	Coulommiers	Coeur de Lion	Lait de vache pasteurisé	Calvados F 14,762,01 CEE
12	Brie*	Cora	Lait de vache pasteurisé	Vosges F 88,115,01 CEE
13	Petit Munster*	Frech	Lait de vache pasteurisé	Bas-Rhin F 67,216,01 CEE
14	Petit Munster*	Petits Amis	Lait de vache pasteurisé	Haut-Rhin F 68,252,02 CEE
15	Petit Munster*	Val de Weiss	Lait de vache pasteurisé	Haut-Rhin F 68,175,01 CEE
16	Petit Munster*	Fermier	Lait de vache pasteurisé	Haut-Rhin F 68 249,02 CEE
17	Petit Munster*	Fermier	Lait cru de vache	Bas-Rhin F 67,216,01 CEE
18	Banon de Chalais	Bourdin	Lait cru de vache	Isère F 38,559,01 CEE
19	Camembert de Normandie*	Lanquetot	Lait cru de vache	Calvados F 14,478,01 CEE
20	Camembert de Normandie*	Lepetit	Lait cru de vache	Calvados F 14,422,01 CEE
21	Camembert de Normandie*	Patrimoine gourmand	Lait cru de vache	Calvados F 14,342,01 CEE
22	Camembert de Normandie*	Isigny Sainte Mère	Lait cru de vache	Calvados F 14,342,01 CEE
23	Camembert de Normandie*	Réo	Lait cru de vache	Manche F 50,267,01 CEE
24	Epoisses*	Lincet	Lait cru de vache	Haute Marne F 52 092,01 CEE
25	Petit Pont-l'Evêque*	Patrimoine gourmand	Lait cru de vache	Calvados F 14,342,01 CEE
26	Petit Livarot*	Lanquetot	Lait cru de vache	Calvados F 14,478,01 CEE
27	Langres*	Germain	Lait de vache thermisé	Haute Marne F 52,092,01 CEE
28	Chaource*	Lanquetot	Lait de vache thermisé	Aube F 10,399,01 CEE
29	Camembert Biologique	Cora	Lait de vache thermisé	Morbihan F 56,179,01 CEE
30	Camembert	Président	Lait de vache thermisé	Calvados F 14,162,01 CEE

(\*) : Fromages à Appellation d'Origine Contrôlée (AOC)

#### II.5.4. Amplification par PCR des gènes impliqués dans la production des carnobactériocines B2 et BM1

Afin de rechercher si la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 produit les carnobactériocines B2 et BM1, une amplification par PCR a été réalisée sur son ADN chromosomique à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 14).

**Tableau 14** : Séquence des amorces pour l'amplification par PCR des gènes impliqués dans la production des carnobactériocines B2 et BM1

Noms des amorces	Séquences	Tm (°C)
Cbn B2 amont	5'-TTCCATGGGTATGGTAAATTATGGTAAGGTGTTTCTTGCAAG-3'	59,56
Cbn B2 aval	5'-TGAATTCTTACGGTCTCCTACCAATGGATCCTG-3'	58,51
Cbn BM1wt amont	5'-TTGGTACCGACGACGACGACAAGGCTATCTTATGGCAATGGTGTTTATTG-3'	64,38
Cbn BM1wt aval	5'-TGAATTCTTAATGTCCCATTCCTGCTAAACTAGAAG-3'	56,88

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Biorad). Le programme d'amplification (cycles de température) est constitué d'une période de dénaturation de l'ADN (95 °C pendant 5 min), de 35 cycles d'amplification (95 °C-1 min, 55 °C-1 min, 75 °C-1 min) et d'une période d'élongation des fragments (75 °C-5 min). Les produits d'amplification sont ensuite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose selon les techniques standards. La présence d'une bande fluorescente de taille attendue (150 pb) sous illumination UV indique la présence des gènes des carnobactériocines B2 et BM1.

#### II.5.5. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse est réalisée en gel d'agarose à 1,8 % (p/v). La suspension d'agarose (Euromedex, Souffelweyersheim, F) est portée à ébullition en tampon TBE 1x. Après refroidissement à 50-55 °C, 2 gouttes de BET (Euromedex) sont ajoutées (concentration finale 0,5 µL.mL<sup>-1</sup>). Le gel est polymérisé et refroidi (Fisherbrand, UK) puis des échantillons de 15 µL, contenant 14 µL d'essai et 1 µL de tampon de charge (Promega, Madison, USA), sont déposés dans les puits. La migration est réalisée sous une tension constante de 50 V pendant 3 h (Apelex, Massy, F) ; les bandes sont ensuite visualisées

dans l'UV à 350 nm et une photographie est réalisée pour archivage (Fischer). Le Smart ladder SF (Eurogentec) est utilisé comme marqueur de taille (100-1000 pb).

## **II.6. FABRICATIONS FROMAGERES**

Deux fabrications fromagères ont été réalisées, le 10 mai 2005 et le 25 avril 2007, afin d'évaluer les aptitudes technologiques de *C. maltaromaticum* LMA 28, de suivre son comportement au cours des différentes étapes de ces fabrications fromagères et de quantifier sa production de composés aromatiques et d'amines biogènes.

### **II.6.1. Fabrication des « petits suprêmes vitalité » 10 mai 2005**

#### **II.6.1.1. Préparation du levain *C. maltaromaticum* LMA 28**

Un volume de 900 mL de bouillon TSB-YE reconstitué, contenant 2,5 g.L<sup>-1</sup> de lactose, a été réparti dans 3 flacons de 500 mL contenant chacun 300 mL de bouillon. Ce milieu a étéensemencé à un taux de 1,4 % (v/v), soit 12 mL pour 900 mL, avec une culture préalable de 48 h à 30 °C de *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE reconstitué contenant 2,5 g.L<sup>-1</sup> de lactose. Après incubation à 30 °C pendant 48 h, les 900 mL de culture sont centrifugés dans une centrifugeuse (Eppendorf) à 10000 × g à 4 °C pendant 15 min. Le culot bactérien est lavé par ajout de tryptone-sel (TS). Après mise en suspension et centrifugation à 10000 × g, ce culot a servi à préparer une suspension en TS (30 mL) qui a été introduite dans 300 mL de lait UHT stérilisé. Ce levain a été stocké à 4 °C pendant 16 h avant son utilisation en fromagerie. La numération de la charge cellulaire initiale a également été réalisée selon la technique des dilutions décimales à l'aide d'un ensemenceur spiral (AES laboratoire).

#### **II.6.1.2. Préparation du lait de fabrication**

Le lait est adapté à une technologie « délactosée » pour la fabrication de ces fromages à pâte molle de petit format (25 g). Du lait pasteurisé est ultrafiltré pour l'obtention de 80 litres de rétentat concentré deux fois. Les paramètres physico-chimiques du rétentat sont : 78,3 g.L<sup>-1</sup> de matières protéiques, 102,6 g.L<sup>-1</sup> de matières grasses, pH 6,80. Le rétentat est stocké à 4 °C pendant 4 jours. La veille du jour de fabrication, 80 L d'eau à 68 °C sont ajoutés aux 80 L de rétentat, afin d'obtenir du lait dont les concentrations en matières

protéiques, en matières grasses et en lactose sont deux fois plus faibles que celles du rétentat (dilution au demi). La concentration en lactose est donc de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  au lieu des  $50 \text{ g.L}^{-1}$  trouvés habituellement dans le lait. Le levain de maturation, R 603, *Lc. lactis* (CHR Hansen, le Moulin d'Aulnay, Arpajon, F) est inoculé à raison de 15 g de poudre lyophilisée. Après cette maturation du lait à  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 16 h, la valeur du pH a diminué de 0,60 unité. Le jour de la fabrication ( $J_0$ ), le lait est pasteurisé à  $77,5 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 20 s. Une culture de levain lactique sur lait, (H 491, Flora Danica® (CHR Hansen) préalablement préparée (pH 4,52,  $113 \text{ }^\circ\text{D}$ ), est inoculée à un taux de 1 % (v/v). Le volume de lait « délactosé » a été réparti dans 4 bassines de forme cubique en matière plastique, à raison de 27 L par bassine. Ces bassines sont codées T (témoin), A, B et C pour les 3 essais contenant respectivement environ  $1.10^1$ ,  $1.10^4$  et  $1.10^7 \text{ ufc.mL}^{-1}$  de la souche test *C. maltaromaticum* LMA 28. L'ajout de cette souche test est réalisé 15 min plus tard, dans le lait de fabrication à  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  (pH 6,40).

### II.6.1.3. Ensemencement et emprésurage du lait de fabrication

Dans les bassines codées A, B et C, la population initiale en *C. maltaromaticum* LMA 28 souhaitée est respectivement d'environ  $1.10^1$ ,  $1.10^4$  et  $1.10^7 \text{ ufc.mL}^{-1}$  de lait de fabrication. Pour l'essai A, 1 mL du levain *C. maltaromaticum* LMA 28 a été dilué au  $1/100^\circ$  et 0,26 mL de cette dilution a été introduit dans 260 mL de lait pasteurisé. Pour l'essai B, 2,6 mL de levain ont été ajoutés à 260 mL de lait. L'essai C correspond à l'ajout de 260 mL de levain.

Après 20 min, le lait est emprésuré par ajout de présure animale (CHR Hansen) à  $520 \text{ mg.L}^{-1}$  de chymosine, à raison de 7 mL pour 27 L de lait. Le temps de prise est de 9 min et le tranchage par découpage en cubes de 15 mm de côté est réalisé 45 min après l'emprésurage. Après 30 min de repos sous sérum, le caillé est moulé. Les paramètres pH et température sont déterminés au moulage, après 2,5, 4,0, 6,0 h et au démoulage (24 h). Les ferments d'affinage ont été ajoutés dans le lait de fabrication, *P. camemberti* Aura 12 (3 doses/1000 L) et *Geotrichum candidum* GCM 33 (0,5 dose /1000 L) de chez Rhodia food (Dangé-St-Romain, F). Des prélèvements de sérum ont été effectués lors du moulage. Des échantillons de fromage ont été prélevés à  $J + 6 \text{ h}$  ( $J_0$ ) puis stockés à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  pour une analyse bactériologique réalisée le lendemain.

## II.6.2. Fabrication de « Montagnard », 25 avril 2007

La fabrication d'une spécialité fromagère à pâte molle à croûte fleurie, dénommée « Montagnard », porte sur 76 L de lait pasteurisé standardisé en vue de l'obtention de 56 fromages d'une masse unitaire, à la vente, de 200 g. Le lait a un taux butyreux de 48 à 50 g de matière grasse (MG) par litre et une teneur en azote total (NT) de 35,5 g.L<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont obtenues par ajout d'un rétentat d'ultrafiltration obtenu à l'aide de membranes ayant un point de coupure de 100 000 Daltons. Le volume du rétentat correspond à 10 % (v/v) du volume total du lait de fabrication. Il est obtenu par concentration volumique d'un facteur 3 de lait entier afin d'obtenir une teneur en azote total de 75 à 80 g.L<sup>-1</sup> et une teneur en matières grasses de 100 g.L<sup>-1</sup>.

Trois expérimentations ont été réalisées afin d'observer le comportement et les modifications technologiques (composés maltés, amines biogènes et évaluation sensorielle) induites par l'addition, en tant que levain d'affinage, de *C. maltaromaticum* LMA 28, à différents taux d'ensemencement.

Le lait standardisé a été réparti dans trois cuves en matière plastique pour un volume unitaire de 76 L ; sa température est de 37,5 °C et celle de la salle de fabrication de 33 °C. Pour cette fabrication « thermophile », *S. thermophilus* a été préalablement cultivé sur lait et a été ajouté à un taux de 0,3 % v/v. Des souches lyophilisées de *Lc. lactis* (5 g/100 L de lait) ont été inoculées dans le lait de fabrication. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 a été préalablement cultivée à 30 °C pendant 24 h dans 3 L de TSB-YE modifié par substitution du glucose par du lactose. Après centrifugation et lavage avec de la TS, l'intégralité du culot cellulaire a été transféré dans 1 L de lait UHT stérilisé demi-écrémé puis placé en réfrigération jusqu'à son utilisation. Le jour de la fabrication fromagère, cette culture a été additionnée pour des volumes de 0 mL (cuve témoin numérotée 1), 0,5 mL (cuve de l'essai correspondant globalement à 1.10<sup>4</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>, numérotée 2) et 999,5 mL (cuve de l'essai correspondant à environ 1.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>, numérotée 3). Des souches d'affinage ont ensuite été ajoutées : deux souches de *Saccharomyces serwazii*, une souche de *Brevibacterium linens*, deux souches de *Geotrichum candidum* et une souche de *Penicillium camemberti*, à un taux d'inoculation faible. Après 20 min, l'emprésurage a été réalisé par ajout de 36 mL de présure pour 100 L de lait (520 mg de chymosine.L<sup>-1</sup> ou force 1 /10000). Après un temps de prise d'environ 8 min, le temps de coagulation totale

est d'environ 35 à 40 min, soit 4 à 5 fois le temps de prise. Le tranchage est réalisé avec un tranche-caillé dont les fils sont distants d'un cm. Le moulage intervient 30 min plus tard par transfert de l'intégralité du contenu de la cuve dans des moules cylindriques, à l'aide d'un répartiteur de caillé. Les fromages sont ensuite égouttés à une température de 29 °C.

Lors de l'égouttage, la température de la salle est progressivement refroidie par paliers successifs jusqu'à 15 °C, température correspondant au salage et à l'affinage, d'une durée de 5 jours. Les fromages sont ensuite soumis à un soin de leur croûte par frottement-lavage avec une suspension de *G. candidum* en eau physiologique colorée en orange avec du rocou. Les fromages sont ensuite entreposés à 13 °C pendant 2 jours avant leur emballage. Un post-affinage est effectué pendant 10 j à 12 °C, puis après un stockage au froid à 4 °C pendant 7 j, les fromages sont placés à 4°C jusqu'à leur date limite de vente (DLV) de 52 jours.

En vue des analyses bactériologiques, des prélèvements ont été effectués sur le laitensemencé et sur les fromages après 1 h d'égouttage. La numération de la flore lactique mésophile totale a été réalisée sur TSA-YE à 30, celle de *S. thermophilus* à 44 °C et celle de *C. maltaromaticum* LMA 28 sur milieu spécifique MCM à 25 °C pendant 48 h. Des analyses sensorielles ont été réalisées à J<sub>20</sub> et à J<sub>40</sub> et des contrôles physico-chimiques (valeurs de pH, extrait sec total) et microbiologiques (recherche de la flore totale mésophile, de *S. thermophilus* et de *C. maltaromaticum*) ont été effectuées à J<sub>7</sub>, J<sub>26</sub>, J<sub>35</sub> et J<sub>47</sub>.

### **II.6.3. Evaluation sensorielle des fromages**

Les séances de dégustation des « Petit suprêmes vitalité » se sont déroulées dans l'entreprise (Bongrain-Gérard SAS), dans des conditions non normalisées, par un panel de huit dégustateurs non entraînés mais habitué à la dégustation de leurs fromages. Ces analyses ont été effectuées à J<sub>20</sub>, J<sub>34</sub> et J<sub>42</sub> après stockage au froid à 4 et à 12 °C.

Les fromages « Le Montagnard » ont été analysés par des tests triangulaires lors des séances d'évaluation sensorielle comprenant 20 juges entraînés. Ces analyses ont été effectuées dans des conditions normalisées à J<sub>35</sub>, et à J<sub>47</sub> après stockage au froid à 4 °C.

Les fiches de dégustation sont reproduites en annexe. La note globale intègre l'odeur du produit entier, l'aspect extérieur de la croûte et de la pâte, la texture en bouche de la croûte et de la pâte ainsi que la flaveur (goût et saveur). Les fiches de dégustation, établies par la Société Bongrain S.A.S., permettent de porter un jugement qualitatif sur les fromages en notant différents descripteurs. Les observations portent sur l'aspect global du fromage, de la coupe, de la croûte, du coeur, puis de son goût. Une note totale est établie à chaque étape et une note globale est finalement attribuée au fromage.

**Chapitre III : Identification phénotypique et génotypique de  
*C. maltaromaticum***



### III.1. ELABORATION D'UN MILIEU DE NUMERATION SELECTIF POUR *CARNOBACTERIUM* SP.

#### III.1.1. Effet inhibiteur du pH entre 6,8 et 9,4 en milieu TSA-YE

L'objectif est de tester l'effet de valeurs alcalines du pH sur le comportement de différentes souches bactériennes, présentes à des fréquences variables dans des fromages au lait cru, comparativement à *C. maltaromaticum* LMA 28.

Pour *C. maltaromaticum* LMA 28, *E. faecalis* CIP 76117 et *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, la population bactérienne ne varie pas de manière significative dans toute la gamme de pH. Pour *Ps. fluorescens* CIP 6913 et *Lb. plantarum* DSM 20174, elle diminue de façon importante pour des valeurs de pH supérieures respectivement à 8,8 et à 7,9. Des valeurs de pH plus élevées empêchent la croissance de *Lb. plantarum* DSM 20174 et donnent des colonies de *Ps. fluorescens* CIP 6913 de très petite taille, difficilement comptables (Tableau 15). La valeur de pH de 8,8 est retenue pour la suite de l'étude.

**Tableau 15:** Comportement de cinq souches bactériennes en fonction du pH en TSA-YE, à 25 °C pendant 24 h

pH	<i>Lb. plantarum</i>	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Ps. fluorescens</i>
6,8	9,6*	9,6	9,6	9,6	9,5
7,9	W	9,5	9,5	9,6	9,6
8,2	W	9,3	9,5	9,5	9,5
8,5	w-	9,4	9,5	9,6	9,6
8,8	-	9,5	9,6	9,6	w
9,1	-	9,6	9,5	9,5	w-
9,4	-	9,4	9,5	9,6	-

(\*) : Numération cellulaire en  $\log_{10}$  ufc.mL<sup>-1</sup> ; (w) : colonies de petite taille ; (w-) : colonies difficilement observables ; (-) : pas de croissance. Moyenne de trois essais indépendants, écart type  $\leq 0,05$ .

**III.1.2. Effet inhibiteur de la gentamicine et de la vancomycine à pH 8,8 en milieu TSA-YE**

Des essais préliminaires avaient montré que des concentrations supérieures à 4 mg.L<sup>-1</sup> en vancomycine et supérieures à 10 mg.L<sup>-1</sup> en gentamicine inhibaient la croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28. Dans nos conditions expérimentales (Tableaux 16 et 17), la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 est résistante à toutes les concentrations en vancomycine utilisées (de 0 à 4 mg.mL<sup>-1</sup>) et en gentamicine (0 à 10 mg.L<sup>-1</sup>) ; cette observation confirme les résultats précédents. La souche *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> est sensible à ces deux antibiotiques, même aux concentrations les plus faibles (2 mg.L<sup>-1</sup>). La souche *Ps. fluorescens* CIP 6913 est résistante à la vancomycine ; cependant sa croissance est ralentie avec formation de très petites colonies à pH basique (Tableau 16). Cette souche est sensible à des concentrations en gentamicine supérieures à 2 mg.L<sup>-1</sup> (Tableau 17). La souche *E. faecalis* CIP 76117 ne pousse pas à des concentrations en vancomycine supérieures à 3 mg.L<sup>-1</sup> (Tableau 16) et elle est sensible à la gentamicine (Tableau 17).

**Tableau 16:** Comportement de quatre souches bactériennes en fonction de concentrations en vancomycine sur milieu TSA-YE à pH 6,8 et à pH 8,8, à 25 °C pendant 24 h

Souches bactériennes	pH 6,80		pH 8,80				
	0*	0	vancomycine (mg.L <sup>-1</sup> )				
			2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
<i>L. monocytogenes</i> CIP 82110 <sup>T</sup>	9,5	9,5	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> CIP76117	9,6	9,5	9,4	8,6	8,1	-	-
<i>C. maltaromaticum</i> LMA28	9,2	9,0	9,3	9,5	9,4	9,4	9,4
<i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913	9,9	w	w	w	w	w	w

(\*) : Numération cellulaire exprimée en log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup> ; (w): colonies de petite taille ; (-) : pas de croissance. Moyenne de trois essais indépendants ; écart type ≤ 0,03.

**Tableau 17:** Comportement de quatre souches bactériennes en fonction de concentrations en gentamicine sur milieu TSA-YE à pH 6,8 et à pH 8,8, à 25 °C pendant 24 h

Souches bactériennes	pH 6,80		pH 8,80				
	gentamicine (mg.L <sup>-1</sup> )						
	0	0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
<i>L. monocytogenes</i> CIP 82110 <sup>T</sup>	9,5	9,5	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> CIP 76117	9,6	9,5	-	-	-	-	-
<i>C. maltaromaticum</i> LMA 28	9,2	9,0	9,5	9,5	9,4	9,3	9,5
<i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913	9,9	w	w	-	-	-	-

(\*) : Numération cellulaire exprimée en log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup> ; (w): colonies de petite taille ; (-) : pas de croissance. Moyenne de trois essais indépendants ; écart type ≤ 0,02.

Une concentration de 3,5 mg.L<sup>-1</sup> en vancomycine permettra de différencier *C. maltaromaticum* LMA 28 d'*E. faecalis* CIP 76117 ; une concentration de 10 mg.L<sup>-1</sup> en gentamicine inhibe fortement toutes les souches bactériennes testées.

### III.1.3. Plan d'expériences

Un plan d'expériences a été construit à partir des données obtenues lors de la préparation des milieux gélosés permettant la croissance sélective de l'espèce *C. maltaromaticum*, plus particulièrement de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28. Les gammes de concentrations relativement étroites, de chacun des trois antibiotiques avaient pour but de bien cerner les conditions non inhibitrices vis-à-vis de cette espèce, mais également de bien différencier la sensibilité des autres souches testées, *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens* et *E. faecalis*, espèces qui sont éventuellement présentes dans l'environnement du fromage.

Les résultats du plan d'expériences peuvent être classés en deux groupes :

- les souches plus ou moins résistantes dont les numérations sont possibles dans les 16 essais (Tableaux 18 et 19) : les numérations bactériennes ( $\log_{10}$ ) sont analysées à l'aide du logiciel Nemrod et les données graphiques sont rapportées dans les figures 8 à 11 (confère III.1.3.2).
- les souches très sensibles à toutes les conditions expérimentales (Tableau 20) : *C. inhibens* CIP 106869, *C. viridans* CIP 107728, *C. divergens* DSM 20623<sup>T</sup>, *C. alterfunditum* CIP 105796, le cocktail de souches Flora Danica<sup>®</sup> et les deux souches bactériennes Gram-négatives. Toutes ces souches sont inhibées à des degrés divers pour les différentes concentrations en antibiotiques retenues dans ce plan d'expériences.

Les bactéries lactiques traditionnelles, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc* sp. du levain commercial Flora Danica<sup>®</sup> sont totalement inhibées. Pour *C. alterfunditum* CIP 105796, une croissance très faible, caractérisée par de très petites colonies, est uniquement observée dans l'essai 2.

La souche *C. divergens* DSM 20623<sup>T</sup> est capable de pousser très lentement seulement dans les essais les moins inhibiteurs (2, 4, 8) et *C. inhibens* CIP 106869 dans les essais 2, 6, 8, 11 et 13 à 16. *Carnobacterium funditum* CIP 106503 ne pousse pas dans nos conditions expérimentales car sa croissance nécessite au minimum 72 h d'incubation.

Parmi la flore Gram-négative, *E. coli* CIP 54.8 donne de très petites colonies difficilement dénombrables dans les essais 4, 5, 9 et 10, tandis qu'une croissance est observée pour *Ps. fluorescens* CIP 6913 dans les essais 4, 7 et 8.

**Tableau 18:** Optimisation du milieu de numération sélective de *C. maltaromaticum* à l'aide d'un plan d'expériences. Souches tests : *C. maltaromaticum* (LMA 28, DSM 20730<sup>T</sup>, « Réo »), *C. gallinarum* DSM 4847<sup>T</sup> et *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup>.

Essais	Souches tests				
	<i>C. maltaromaticum</i> LMA 28	<i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730 <sup>T</sup>	<i>C. maltaromaticum</i> "Réo"	<i>C. mobile</i> DSM 4848 <sup>T</sup>	<i>C. gallinarum</i> DSM 4847 <sup>T</sup>
1	8,4*	6,6	8,2	8,3	0 <sup>a</sup>
2	9,0	9,2	9,3	8,6	6,0
3	8,7	8,2	8,7	8,5	0 <sup>a</sup>
4	9,0	9,2	9,3	8,6	6,0
5	9,0	8,3	8,8	8,5	4,8
6	9,0	9,1	9,2	8,6	6,0
7	9,0	8,2	8,8	8,5	4,8
8	8,9	9,3	9,3	8,6	5,9
9	9,0	8,2	8,7	8,5	4,4
10	8,9	8,9	9,1	8,6	5,3
11	8,9	9,2	9,2	8,5	5,9
12	8,9	8,9	9,2	8,6	5,1
13	8,9	8,8	9,0	8,6	5,2
14	8,9	8,8	9,0	8,5	5,3
15	8,9	8,7	9,3	8,6	5,3
16	8,9	8,8	9,1	8,5	5,2
<b>Témoin pH 6,8</b>	9,0	8,7	9,4	8,9	9,0
<b>Témoin pH 8,8</b>	9,0	9,3	9,4	8,9	9,0

(\*) : Numération cellulaire exprimée en log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup> ; (a) : absence de colonies dans 50 µL de culture bactérienne ; (C) : *Carnobacterium* ; (<sup>T</sup>) : souche type ; Écart type = 0,130, généré par le logiciel Nemrod<sup>®</sup>.

**Tableau 19:** Optimisation du milieu de numération de *C. maltaromaticum* à l'aide d'un plan d'expériences. Souches tests : *E. faecalis* CIP 76117, *Ps. fluorescens* CIP 6913, *D. incerta* CIP 104227, *C. viridans* CIP 107728.

Essais	Souches tests		
	<i>D. incerta</i> CIP 104227	<i>E. faecalis</i> CIP 76117	<i>C. viridans</i> CIP 107728
1	7,9*	1,3	2,2
2	9,4	4,7	9,0
3	6,6	2,1	2,8
4	7,3	4,6	7,0
5	7,2	2,3	2,9
6	8,4	4,5	7,0
7	7,2	1,6	3,0
8	8,5	4,3	7,0
9	7,2	2,1	3,0
10	7,8	4,3	3,0
11	8,7	4,5	8,0
12	7,9	4,1	3,1
13	7,9	4,1	3,0
14	7,9	4,1	2,9
15	7,9	4,0	2,9
16	7,9	4,1	2,8
<b>Témoin pH 6,8</b>	9,4	9,5	9,0
<b>Témoin pH 8,8</b>	9,4	9,5	9,0

(\*) : Numération cellulaire exprimée en  $\log_{10}$  ufc.mL<sup>-1</sup>; (D) : *Dezemsia*; (E) : *Enterococcus*; (C) : *Carnobacterium*. Écart type = 0,130, généré par le logiciel Nemrod®.

**Tableau 20** : Optimisation du milieu de numération de *C. maltaromaticum* à l'aide d'un plan d'expériences. Souches tests : *C. alterfunditum* CIP 105796, *C. inhibens* CIP 106869, *C. divergens* DSM 20623<sup>T</sup>, *Ps. fluorescens* CIP 6913, *E. coli* CIP 54.8, Flora Danica<sup>®</sup>

Essais	Souches tests						
	<i>C. inhibens</i> CIP 106869	<i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913	Flora Danica <sup>®</sup>	<i>C. alterfunditum</i> CIP 105796	<i>C. divergens</i> DSM 20623 <sup>T</sup>	<i>L. monocytogenes</i> CIP 82110 <sup>T</sup>	<i>E. coli</i> CIP 54.8
1	0* <sup>\$</sup>	0*	0*	0*	0*	0*	0*
2	+**	0*	0*	+**	+**	2,8	0*
3	0*	0*	0*	0	0*	0*	0*
4	0*	+**	0*	0*	+**	2,6	+**
5	0*	0*	0*	0*	0*	1,3	+**
6	+**	0*	0*	0*	0*	2,1	0*
7	0*	+**	0*	0*	0*	1,3	0*
8	+**	+**	0*	0*	+**	2,5	0*
9	0*	0*	0*	0*	0*	0	+**
10	0*	0*	0*	0*	0*	1,6	+**
11	+**	0*	0*	0*	0*	2,2	0*
12	0*	0*	0*	0*	0*	1,9	0*
13	+**	0*	0	0*	0*	0*	0*
14	+**	0*	0*	0*	0*	0*	0*
15	+**	0*	0*	0*	0*	0*	0*
16	+**	0*	0*	0*	0*	0*	0*
<b>Témoin pH 6,8</b>	9,0	9,0	9,0	9,0	9,1	9,0	9,0
<b>Témoin pH 8,8</b>	9,0	9,0	9,0	9,0	9,12	9,0	9,0

(<sup>\$</sup>) : Numération cellulaire exprimée en log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup> (\*) : absence de colonies dans 50 µL de culture bactérienne ; (\*\*+) : très petites colonies non aisément dénombrables ; C : *Carnobacterium*; Ps : *Pseudomonas*; E : *Escherichia* ; L : *Listeria* ; (<sup>T</sup>) : souche type Écart type = 0,130, généré par le logiciel Nemrod<sup>®</sup>

### III.1.3.1. Equations polynomiales représentant les réponses expérimentales

Les équations polynomiales pour sept souches plus ou moins résistantes sont rapportées ci-dessous, donc cinq appartiennent au genre *Carnobacterium*.

***C. maltaromaticum* LMA 28** :  $\text{Log}_{10}N = 8,925^a - 0,160v^c - 0,021g + 0,008n - 0,220v^2 + 0,110g^2 + 0,075n^2 - 0,064vg + 0,010vn + 0,173gn$   
 $R^2 = 0,684$ ;  $R^2A = 0,210$

La vancomycine (v) et la gentamicine (g) exercent un impact négatif sur la croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28 car les coefficients de ces deux facteurs sont respectivement -0,160 et -0,021. Afin d'optimiser la croissance de cette souche, il faudrait diminuer les concentrations de ces deux antibiotiques par rapport à celles calculées du centre du domaine expérimental (respectivement de 3,5 mg.L<sup>-1</sup> pour la vancomycine et de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> pour la gentamicine).

***C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>** :  $\text{Log}_{10}N = 8,740^a - 1,149v^a - 0,054g - 0,006n - 0,840v^{2a} + 0,227g^2 + 0,211n^2 - 0,023vg + 0,027vn + 0,119gn$   
 $R^2 = 0,985$ ;  $R^2A = 0,961$

***C. maltaromaticum* "Réo"** :  $\text{Log}_{10}N = 9,112^a - 0,531v^a - 0,056g + 0,014n - 0,387v^{2b} - 0,017g^2 + 0,020n^2 - 0,040vg + 0,125vn - 0,032gn$   
 $R^2 = 0,971$ ;  $R^2A = 0,928$

***C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup>** :  $\text{Log}_{10}N = 8,542^a - 0,119v^a + 0,001g - 0,004n - 0,108v^2 + 0,059g^2 + 0,038n^2 + 0,012vg + 0,096vn - 0,015gn$   
 $R^2 = 0,923$ ;  $R^2A = 0,808$

Comparativement à *C. maltaromaticum* LMA 28, *C. gallinarum* DSM 4847<sup>T</sup> est plus sensible à ces deux antibiotiques. Ils exercent un effet inhibiteur plus accentué sur sa croissance. Les coefficients des facteurs générés par le logiciel Nemrod<sup>®</sup> sont respectivement de - 2,695 pour la vancomycine et -0,986 pour la gentamicine. Afin de permettre la croissance optimale de cette souche, il faudra diminuer de façon importante la

concentration en vancomycine par rapport à celle observée au centre du domaine expérimental.

$$\begin{aligned} \text{C. gallinarum DSM 4847}^T : \text{Log}_{10}N &= 5,260^a - 2,695v^a - 0,986g + 0,078n - 2,185v^2 - \\ &0,675g^2 + 0,670n^2 - 2,650vg^c + 1,151vn + 0,629gn \\ R^2 &= 0,910; R^2A = 0,115 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{D. incerta CIP 104227} : \text{Log}_{10}N &= 7,898^a - 0,975v^a + 0,091g + 0,092gn + 0,737v^2 - \\ &0,956g^{2b} + 0,016n^2 - 0,958vg^c + 0,180vn - 0,563gn \\ R^2 &= 0,950; R^2A = 0,875 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{E. faecalis CIP 107728} : \text{Log}_{10}N &= 4,080^a - 2,063v^a - 0,065g - 0,104n - 1,100v^{2b} - \\ &0,607g^2 - 0,496n^2 - 0,058vg - 0,384vn - 1,268gn \\ R^2 &= 0,970 ; R^2A = 0,925 \end{aligned}$$

Cette souche est très sensible à la présence des deux antibiotiques, car la valeur de 4,080 observée au centre du domaine, indique un niveau de population de 5 log<sub>10</sub> inférieure à celui des essais témoins.

(Abréviation : v : vancomycine ; g : gentamicine ; n : acide nalidixique ; C : *Carnobacterium* ; D : *Desemzia* ; E : *Enterococcus* ; R<sup>2</sup>A : R<sup>2</sup>ajusté, <sup>a</sup> : p < 0,001 ; <sup>b</sup> : 0,001 ≤ p < 0,01 ; <sup>c</sup> : 0,01 ≤ p < 0,1).

Les concentrations retenues en vancomycine exercent un effet inhibiteur (-2,063) sur la souche *E. faecalis* CIP 107728, supérieur à celui de la gentamicine (-0,065). Les trois souches de *C. maltaromaticum* (LMA 28, DSM 20730<sup>T</sup>, « Réo ») et *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup> sont les plus résistantes à la vancomycine que *C. viridans* CIP 107728 et que *C. gallinarum* DSM 4847<sup>T</sup>. Dans ce genre bactérien, les souches les plus sensibles sont *C. divergens* DSM 20623<sup>T</sup>, *C. inhibens* CIP 106869 et *C. alterfunditum* CIP 105796. Dans nos conditions expérimentales (TSA-YE, pH 8,8, incubation pendant 48 h à 30 °C), *C. funditum* CIP 106503 ne s'est pas développé.

La gentamicine n'exerce pas un effet inhibiteur important d'où son faible intérêt dans la formulation du milieu sélectif. Elle sera cependant conservée. L'acide nalidixique ne joue aucun rôle inhibiteur vis-à-vis des souches Gram-positives.

Ce plan d'expériences met en évidence la sensibilité plus importante d'*E. faecalis* CIP 76117 et de *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> dans 50 µL d'inoculum, soit  $N < 20 \text{ ufc.mL}^{-1}$ . Dans nos conditions opératoires, les souches lactiques du levain commercial Flora Danica<sup>®</sup> sont inhibées par la valeur élevée du pH et *E. coli* CIP 54.8 est sensible à l'acide nalidixique ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

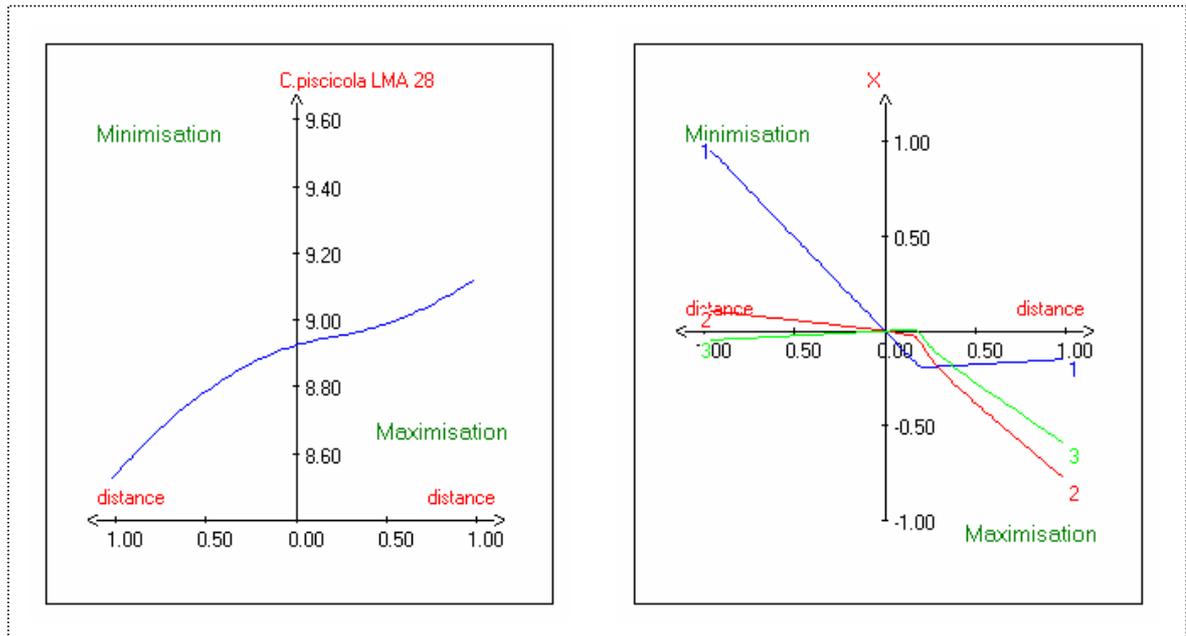
Ces résultats permettent de proposer un milieu de numération approprié pour la numération des souches de *C. maltaromaticum* mais également de celles des espèces *D. incerta* et *C. mobile*. Il est fortement inhibiteur vis-à-vis des souches d'altération ou pathogènes, comme *E. faecalis* et *L. monocytogenes*. Sa formulation, sous forme de bouillon, peut également permettre une étape d'enrichissement lors d'analyses de produits alimentaires, suivie d'une étape de dénombrement sur ce milieu rendu solide par ajout de gélose.

Le centre du domaine expérimental est retenu pour la « construction » du milieu de culture sélectif pour *C. maltaromaticum*. La composition de ce milieu provoque une diminution d'environ  $5 \log_{10}$  de la population en *E. faecalis* et une forte inhibition (absence de colonies de *L. monocytogenes*) pour des populations bactériennes initiales d'environ  $10^9 \text{ ufc.mL}^{-1}$ .

Ces essais montrent une très grande diversité de réponses dans la sensibilité des espèces du genre *Carnobacterium*, notamment vis-à-vis de la vancomycine. La gentamicine n'exerce qu'une action très faible ; l'acide nalidixique, inhibiteur des bactéries à Gram-négatif, doit être utilisé à une concentration de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ . L'addition d'amphotéricine ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) peut-être envisagée, bien que les courtes durées d'incubation (36 à 48 h à 25 °C) ne permettent pas d'observer la croissance de moisissures.

### III.1.3.2. Etude du chemin optimal

Pour *C. maltaromaticum* LMA 28, l'étude du chemin optimal pour la réponse montre que les concentrations retenues en vancomycine ne sont pas inhibitrices, ce qui se traduit par une très faible différence entre la concentration retenue ( $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et la concentration optimisée ( $3,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ). La gentamicine n'exerce pas un effet inhibiteur important d'où l'intérêt de diminuer sa concentration à  $2,7 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figure 8). L'acide nalidixique ne joue aucun rôle inhibiteur vis-à-vis de cette souche Gram-positif.

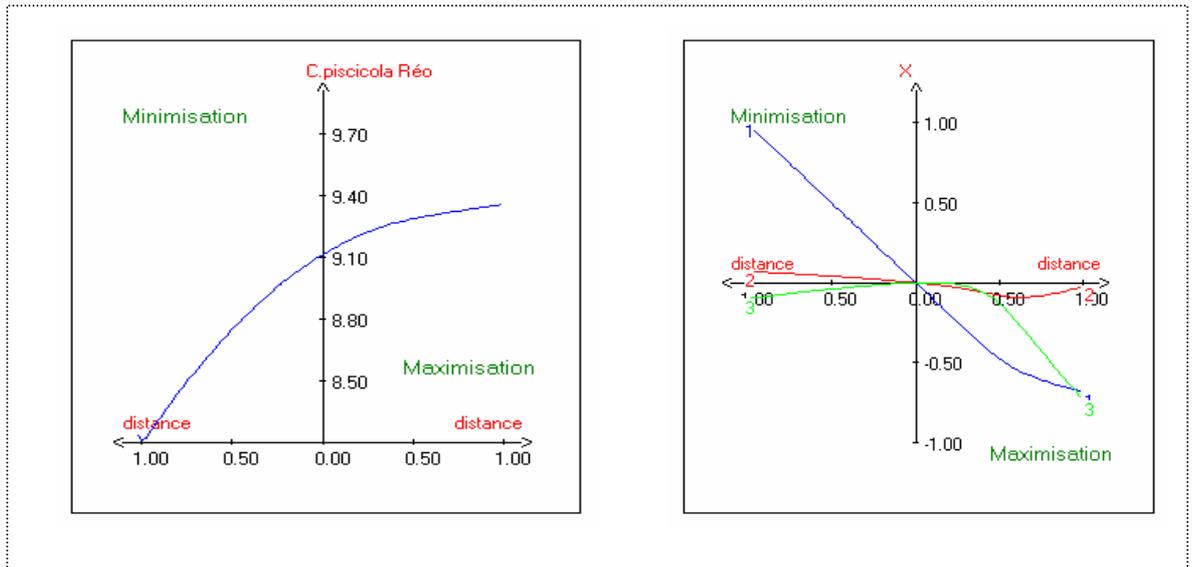


**Figure 8:** Chemin optimal pour la réponse de *C. maltaromaticum* LMA 28

1: vancomycine; 2: gentamicine; 3: acide nalidixique; *C. Carnobacterium. C. piscicola*  $\equiv$  *C. maltaromaticum*

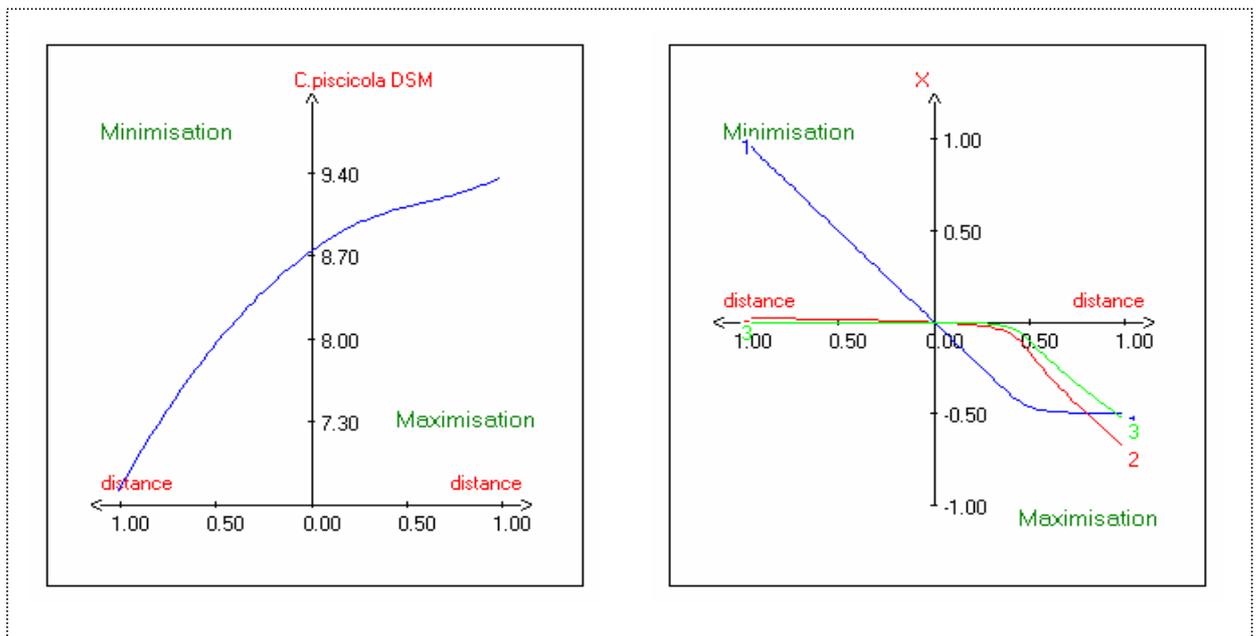
Pour la souche *C. maltaromaticum* « Réo », l'étude du chemin optimal pour la réponse montre que les concentrations des trois antibiotiques, prises au centre du domaine, sont faiblement inhibitrices, puisque la population bactérienne atteint 9,10 log<sub>10</sub>. Cette valeur peut être améliorée, jusqu'à un niveau de 9,40 log<sub>10</sub>, mais en modifiant les concentrations en chacun des antibiotiques :

- pour la vancomycine (facteur 1), dont la gamme de concentrations varie entre 2,5 et 4,5 mg.L<sup>-1</sup> (incrément de 0,5), la concentration optimisée correspond à -0,65, soit à 2,8 mg.L<sup>-1</sup> (Figure 9).
- pour la gentamicine, dont la gamme de concentration varie entre 2 et 8 mg.L<sup>-1</sup> (incrément de 1,0), la concentration optimisée correspond au centre du domaine expérimental, soit à 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Ainsi, la composition du milieu de numération sélectif pour cette souche serait : vancomycine, 2,8 et gentamicine 5,0 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figure 9:** Chemin optimal pour la réponse de la souche *C. maltaromaticum* « Réo »  
 1: vancomycine; 2: gentamicine; 3: acide nalidixique; *C. Carnobacterium*. *C. piscicola* = *C. maltaromaticum*

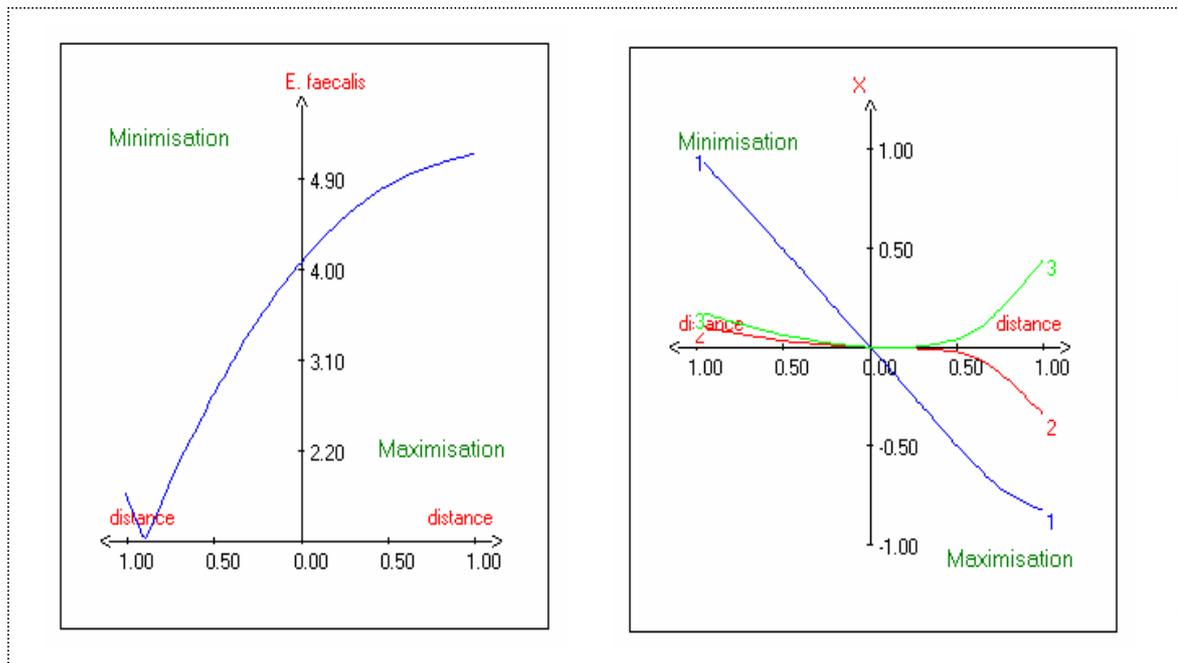
- pour *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, la concentration en vancomycine au centre du domaine expérimental (3,5 mg.L<sup>-1</sup>) n'est pas fortement inhibitrice comparativement à la concentration optimisée de 3 mg.L<sup>-1</sup> (Figure 10). Comme attendu, la gentamicine et l'acide nalidixique n'exercent aucun effet inhibiteur vis-à-vis de cette souche.



**Figure 10:** Chemin optimal pour la réponse de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>  
 1: vancomycine; 2: gentamicine; 3: acide nalidixique; *C. Carnobacterium*. *C. piscicola* ≡ *C. maltaromaticum*

La souche *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup> est plus sensible que la précédente à ces conditions expérimentales. Les figures des chemins optima qui permettent de déterminer les concentrations optimisées en antibiotiques d'un milieu de numération adapté à cette souche sont rapportées dans l'Annexe 1 et dans le tableau 21.

Pour la souche *E. faecalis* CIP 76117, les concentrations en antibiotiques, correspondant au centre du domaine expérimental, sont partiellement inhibitrices, car la population est seulement de 4,0 log<sub>10</sub>, contre 9,0 log<sub>10</sub> pour l'essai témoin, sans antibiotiques (Figure 11).



**Figure 11** : Chemin optimal pour la réponse de *E. faecalis* CIP 76117

1: vancomycine; 2: gentamicine; 3: acide nalidixique ; *E. Enterococcus*.

La souche *D. incerta* CIP 104227 est sensible à la vancomycine (Annexe 1). Les concentrations en antibiotiques, d'un milieu de numération adapté à cette souche, sont rapportées dans le tableau 21.

**Tableau 21:** Concentrations optimales en vancomycine et en gentamicine d'un milieu sélectif pour la croissance de souches appartenant aux genres *Carnobacterium* et *Desemzia* à 25 °C

Souches bactériennes	Antibiotiques	
	Vancomycine	Gentamicine
<i>C. maltaromaticum</i> LMA 28	3,3*	2,7
<i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730 <sup>T</sup>	3,0	2,5
<i>C. maltaromaticum</i> "Réo"	2,8	5,0
<i>C. mobile</i> DSM 4848 <sup>T</sup>	3,0	5,6
<i>D. incerta</i> CIP 105796	2,7	6,9

(\*): Concentrations optimales en mg.L<sup>-1</sup>. Résultats obtenus à partir des chemins optima du plan d'expériences ; Dans la gamme de concentration en acide nalidixique (0-40 mg.L<sup>-1</sup>), aucun effet inhibiteur significatif n'est observé vis-à-vis de ces souches Gram-positives.

#### III.1.4. Validation du milieu *Carnobacterium maltaromaticum* (MCM)

L'objectif de cette étude est de prouver que le milieu CM n'est pas inhibiteur vis-à-vis de souches de l'espèce *C. maltaromaticum*, afin qu'il puisse servir de milieu de dénombrement.

##### III.1.4.1. *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28

Le milieu sélectif CM est comparé au milieu de référence TSA-YE, aux valeurs de pH de 6,8 et de 8,8, afin de vérifier qu'il n'exerce pas d'inhibition significative vis-à-vis de la souche test *C. maltaromaticum* LMA 28. Les résultats des numérations bactériennes, réalisées 10 fois, à partir de dilutions appropriées (-5, -6) sont rapportés dans le tableau 22. Sur milieu TSA-YE, comparativement à la valeur de pH de 6,8 (valeur de référence), la valeur de 8,8 n'est pas inhibitrice pour cette souche puisque les moyennes des numérations sont respectivement de  $9,36 \pm 0,06$  et de  $9,34 \pm 0,05$  (log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>). Sur milieu CM (TSA-YE, pH 8,8 supplémenté en antibiotiques), la population est de  $9,31 \pm 0,06$  (log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>).

**Tableau 22:** Validation du milieu CM pour le dénombrement de *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28

Essais	Milieux de numération		
	Témoin TSA-YE pH 6,8	Témoin TSA-YE pH 8,8	CM
1	9,3*	9,3	9,2
2	9,4	9,3	9,2
3	9,5	9,4	9,3
4	9,4	9,3	9,3
5	9,3	9,4	9,3
6	9,4	9,3	9,3
7	9,4	9,3	9,4
8	9,3	9,3	9,4
9	9,4	9,4	9,3
10	9,3	9,4	9,4
<b>Moyenne</b>	<b>9,4</b>	<b>9,3</b>	<b>9,3</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>

(\*): Numérations cellulaires en  $\log_{10}$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Témoin TSA-YE, pH 6,8 ; témoin TSA-YE, pH 8,8 (ajusté avec NaOH 1N) ; milieu CM (TSA-YE pH 8,8, 3,5 g.l<sup>-1</sup> de vancomycine, 5 g.l<sup>-1</sup> de gentamicine, 20 g.l<sup>-1</sup> d'acide nalidixique). Ensemencement à l'aide de l'ensemenceur spirale à partir d'une suspension mère de  $1.10^9$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Incubation des boîtes de Petri à 25 °C pendant 48 h.

#### III.1.4.2. Cocktail de souches bactériennes

L'objectif est de confirmer la sélectivité du milieu CM vis-à-vis de *C. maltaromaticum* LMA 28, en analysant son activité inhibitrice sur des souches pures et sur des cocktails de souches (cocktail-, sans *C. maltaromaticum* LMA 28 ou cocktail +, avec *C. maltaromaticum* LMA 28).

Dans les essais réalisés avec les souches pures isolées, seule *C. maltaromaticum* LMA 28 est capable de former des colonies visibles sur milieu CM dont le nombre n'est pas significativement différent de celui observé sur TSA-YE pH 6,8 ou sur TSA-YE pH 8,8,

résultat qui confirme les observations précédentes (Tableau 23) : le milieu CM n'est pas inhibiteur pour cette souche.

Le milieu CM est inhibiteur vis-à-vis des 4 souches présentes dans le cocktail. Seule la présence de *C. maltaromaticum* LMA 28 est aisément détectée. Ce milieu offre une potentialité d'application intéressante pour dénombrer sélectivement *C. maltaromaticum* LMA 28 au sein d'un consortium de souches présent dans l'environnement du fromage.

**Tableau 23:** Validation du milieu *Carnobacterium maltaromaticum* (CM)

Essais	Milieux de dénombrement		
	Témoin TSA-YE pH 6,8	Témoin TSA-YE pH 8,8	MCM
<i>C. maltaromaticum</i> LMA 28	9,3*	9,4	9,5
<i>E. faecalis</i> CIP 76117	9,5	9,5	-
<i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913	9,6	Petites colonies	-
<i>L. monocytogenes</i> CIP 82110	9,4	9,5	-
<i>E. coli</i> CIP 54.8	9,5	9,5	-
Cocktail-	ND	ND	-
Cocktail+	ND	ND	9,2

(Cocktail -) : suspension comprenant 1 mL de la suspension mère de chacune des souches : *E. faecalis* CIP 76117, *Ps. fluorescens* CIP 6913, *L. monocytogenes* CIP 82110, *E. coli* CIP 54.8; cocktail+ : suspension comprenant des quantités identiques de *C. maltaromaticum* LMA 28, *E. faecalis* CIP 76117, *Ps. fluorescens* CIP 6913, *L. monocytogenes* CIP 82110, *E. coli* CIP 54.8 ; (ND) : non déterminé ; (-) : pas de croissance ; (\*) : numérations cellulaires en  $\log_{10}$  ufc.mL<sup>-1</sup> ; MCM : milieu de numération sélective pour *C. maltaromaticum*.

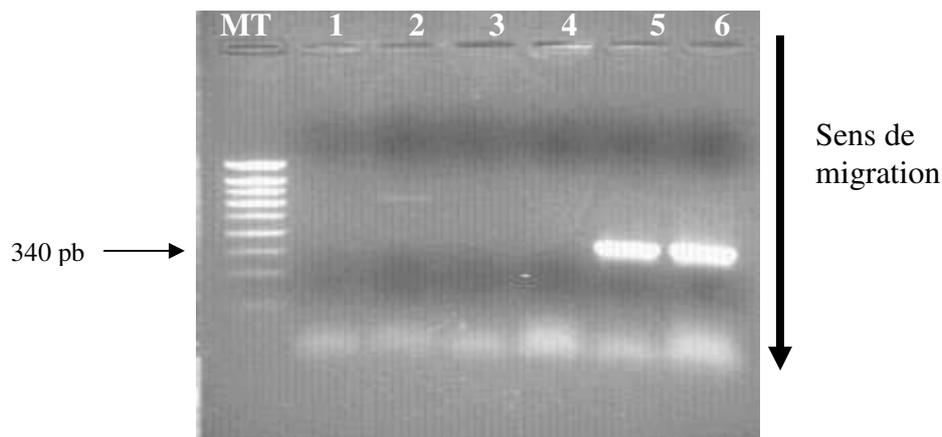
## III.2. OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DE PCR POUR L'IDENTIFICATION DE *C. MALTAROMATICUM*

### III.2.1. Identification de *Carnobacterium* sp.

Les travaux de Minguindou-Mabiala (2004) avaient mis au point un protocole d'identification du genre *Carnobacterium* dans des fromages, par l'amplification de l'ARNr 16S en utilisant la technique de PCR. Cette étude a montré que le couple d'amorces Cb1-Cb2R donnait une bande de 340 pb lors de l'amplification des souches du

genre *Carnobacterium*, à une température d'hybridation de 67 °C. Cependant, ces conditions opératoires ne permettant pas de définir l'espèce, cette étude a été poursuivie en vue d'une identification jusqu'à l'espèce bactérienne.

Dans cette optique, les couples d'amorces 23SF-Cpis et Cb1-Cb2R ont été retenus mais les conditions de PCR n'ont pas été modifiées. La température d'hybridation a été abaissée à 55 °C et la concentration en MgCl<sub>2</sub> a été fixée à 1,5 mM. Les amplifications avec les couples d'amorces 23SF-Cpis, spécifiques à l'espèce *C. maltaromaticum*, n'ont pas donné d'amplifiats (Figure 12) ; seul le couple d'amorces Cb1-Cb2R, spécifique au genre *Carnobacterium*, donne une bande de 340 pb, avec les ADN des souches *C. maltaromaticum* 5 et *C. maltaromaticum* LMA 28 ; résultat similaire à celui obtenu par Cailliez-Grimal *et al.* (2005).



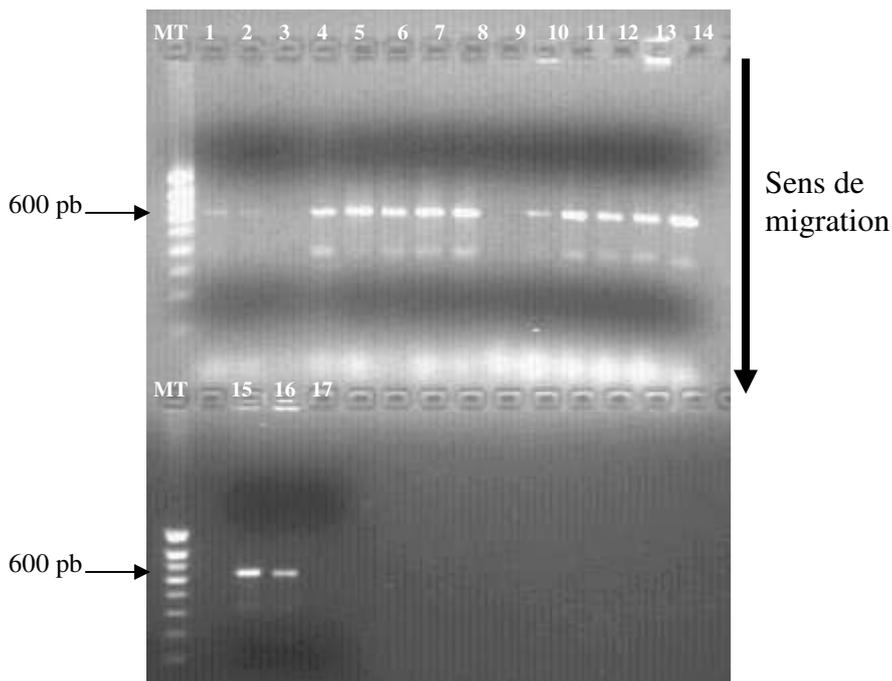
**Figure 12:** Electrophorèse des produits de la PCR réalisée avec les couples d'amorces 23SF-Cpis (piste 1 à 3) et Cb1-Cb2R (pistes 4 à 6)  
(M) : marqueur de taille (Smart ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; pistes 1 et 4 : témoin eau ; pistes 2 et 5 : *C. maltaromaticum* Cp5 (souche de référence) ; pistes 3 et 6 : *C. maltaromaticum* LMA 28 (souche test)

Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec celui de Rachman *et al.* (2004) qui ont montré que l'utilisation du couple d'amorce 23SF-Cpis permettait une identification de l'espèce *C. maltaromaticum*. Il est établi que, toute mise au point d'une réaction de PCR nécessite l'optimisation préalable des conditions de la réaction afin de parvenir à l'amplification sélective du fragment recherché. Nos résultats obtenus avec le couple d'amorces Cb1-Cb2R, montrent que l'ADN matriciel était débarrassé des inhibiteurs de la PCR et que la quantité d'amorces était suffisante pour cette réaction d'hybridation. L'ion Mg<sup>2+</sup>, qui est un cofacteur de la Taq polymérase, interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brins d'ADN et favorisant donc

la stabilité de l'hybridation. L'augmentation de sa concentration pourrait ainsi faciliter l'hybridation.

### III.2.2. Optimisation de la méthode de PCR par l'augmentation de la concentration en $MgCl_2$

L'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  de 1,5 à 5 mM, avec un incrément de 0,5 mM, a permis d'observer une bande de 600 pb avec le couple d'amorces 23SF-Cpis, spécifique de l'espèce *C. maltaromaticum*. Pour la souche *C. maltaromaticum* 5 (souche de référence), la concentration en  $MgCl_2$  minimale, permettant d'obtenir cette bande, caractéristique de l'espèce, est de 3 mM. Pour *C. maltaromaticum* LMA 28 (souche test), cette concentration est de seulement 2 mM, mais des concentrations supérieures donnent des bandes plus nettes (Figure 13).

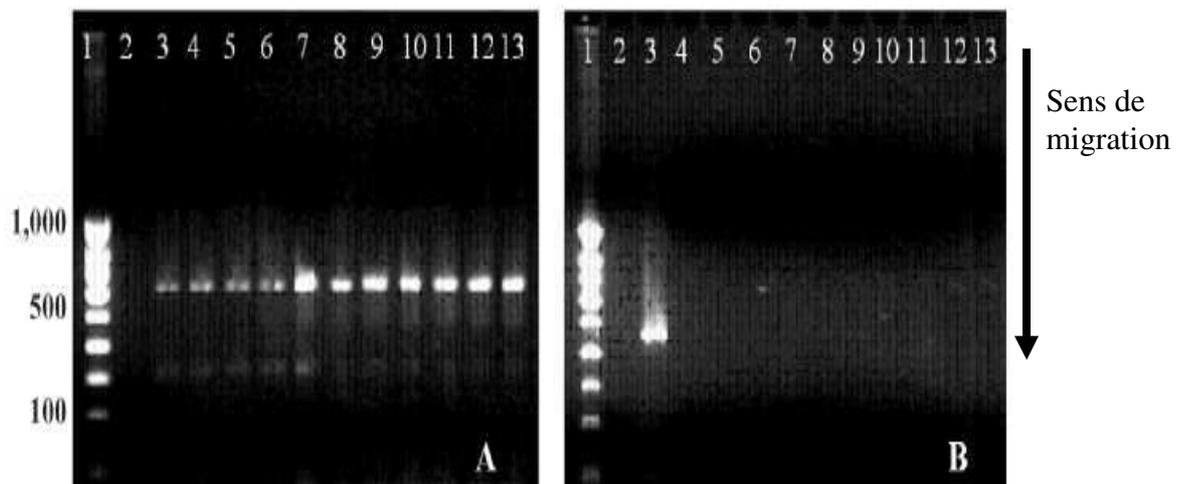


**Figure 13:** Electroforèse des produits de la PCR réalisée avec le couple d'amorces 23SF-Cpis et les ADN de *C. maltaromaticum* 5 et de *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la concentration en  $MgCl_2$

(MT) : marqueur de taille (Smart ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; pistes 1 à 8 : ADN de *C. maltaromaticum* 5 avec des concentrations croissantes en  $MgCl_2$  de 1,5 mM ; piste 1 incrément de 0,5 jusqu'à 5 mM (puit 8) ; pistes 9 à 16 : ADN de *C. maltaromaticum* LMA 28 avec des concentrations croissantes en  $MgCl_2$  de 1.5 à 5 mM ; piste : 17 : témoin eau

### III.2.3. Validation de la technique de PCR sur la recherche de *C. maltaromaticum* dans 30 fromages français

Cette méthode a été validée par la recherche de *Carnobacterium* sp. dans 30 fromages au lait cru ou pasteurisé de vache, de chèvre ou de brebis, dont 20 fromages d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC), fabriqués en automne et au printemps. Les résultats ont montré que les amplifiats d'ADN, provenant de 5 fromages (Brique de Jussac, Petit Munster Val de Weiss, Petit Munster fermier, Camembert Réo, Epoisses), obtenus avec le couple d'amorces Cb1-Cb2R donnent une seule bande de 340 pb. Après une étape de pré-enrichissement dans le milieu sélectif de numération CM, les amplifiats d'ADN provenant de 5 autres fromages (Pérail, Picodon, Petit Munster Petits Amis, Camembert Isigny, Petit Livarot) donnent aussi une seule bande de 340 pb avec ce couple d'amorces.



**Figure 14:** Electrophorèse des produits de l'amplification par PCR réalisée avec les couples d'amorces (A) Cpis-23S-7 et (B) Cdiv-23S-7

piste 1 : marqueurs de taille (Smarter Ladder SF de 100 à 1000 pb) ; piste 2 : témoin négatif, (eau) ; piste 3 : témoins positifs, *C. maltaromaticum* LMA 28 (A) et *C. divergens* DSM 20624<sup>T</sup> (B) ; (piste 4) : Pérail (Lou Pérac) ; piste 5 : Brique de Jussac (Jussac) ; piste 6 : Picodon (Rians) ; piste 7 : Petit munster (Petits Amis) ; piste 8 : Petit Munster (Val de Weiss) ; piste 9 : Petit Munster (Fermier) ; piste 10 : Camembert de Normandie (Isigny) ; piste 11 : Camembert de Normandie (Réo) ; piste 12 : Epoisses (Lincet) ; piste 13 Petit Livarot (Lanquelot) ; (<sup>T</sup>) : souche type.

Les amplifiats d'ADN provenant de ces 10 fromages ont montré des résultats positifs avec le couple d'amorce 23SF-Cpis, spécifique de l'espèce *C. maltaromaticum* (Figure 14). La recherche des autres espèces a été infructueuse. En effet, Collins *et al.* (1987) ; Franzmann *et al.* (1991) ; Jobörn *et al.* (1999) ; Holley *et al.* (2002) ; Pikuta *et al.* (2005), avaient

montré que ces autres espèces de ce genre bactérien n'étaient pas d'origine laitière. Cependant les travaux de Millière et Lefebvre, (1994) ; Morea *et al.* (1999) avaient montré la présence de *C. divergens* dans des fromages. Les études antérieures de Millière *et al.* (1994) avaient mis en évidence *C. maltaromaticum* uniquement dans des fromages au lait de vache, mais notre étude a montré que cette espèce était aussi présente dans les fromages au lait de brebis (Pérail).

La méthode de PCR a le mérite d'être facile à mettre en oeuvre et est très rapide, comparée aux méthodes de microbiologie classique. Cependant, elle ne permet pas de quantifier la population bactérienne. Il s'avère donc intéressant de poursuivre cette étude en vue de mettre au point un protocole de PCR quantitative afin de quantifier les populations bactériennes de *C. maltaromaticum*.

### III.3.. RECHERCHE DE BACTERIOCINES PRODUITES PAR *C. MALTAROMATICUM* LMA 28

#### III.3.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de *C. maltaromaticum* LMA 28 a été testée vis-à-vis de *S. thermophilus* INRA 302, *Lc. lactis* DSM 20481, *L. ivanovii* CIP 12510 et de *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>. Dans le TSB-YE, *C. maltaromaticum* LMA 28 n'exerce pas d'activité bactéricide décelable contre *S. thermophilus* INRA 302 et *Lc. lactis* DSM 20481 (Tableau 24). Ce résultat est intéressant car *Lc. lactis* et *S. thermophilus*, souches d'intérêt technologique, peuvent se trouver associées avec *C. maltaromaticum* lors de la fabrication de certaines spécialités fromagères. En revanche, *C. maltaromaticum* LMA 28 exerce une activité contre *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> et *L. ivanovii* CIP 12510, avec des diamètres d'inhibition respectivement de  $4,0 \pm 1,0$  et de  $6,0 \pm 0,8$  mm.

Dans le lait, les résultats sont similaires à ceux observés sur le milieu TSB-YE. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 montre une activité contre *L. ivanovii* CIP 12510 ( $3,0 \pm 1,0$  mm) et *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> ( $1,5 \pm 0,5$  mm). Comme précédemment indiqué, elle est inactive vis-à-vis de *S. thermophilus* INRA 302 et de *Lc. lactis* DSM 20481. L'activité antibactérienne de l'espèce *C. maltaromaticum*, contre *Listeria* sp., a été mentionnée par Buchanan et Klawitter (1991), Mathieu *et al.* (1993) et Quadri *et al.* (1994). Ce résultat

présente un intérêt potentiel dans l'amélioration de la conservation des aliments, si *C. maltaromaticum* est utilisé comme flore d'affinage.

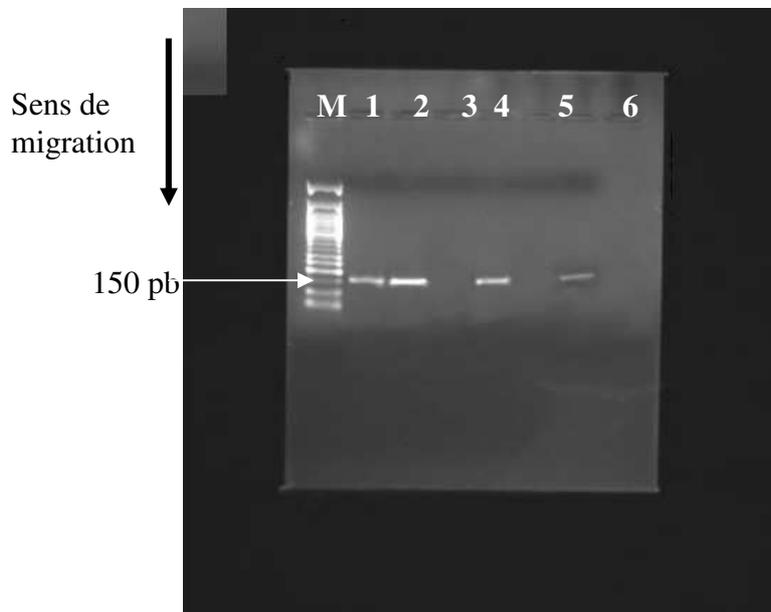
**Tableau 24:** Activité antibactérienne de *C. maltaromaticum* LMA 28

Souches cibles	Milieux nutritifs	
	TSB-YE	lait
<i>S. thermophilus</i> INRA 302	0*	0
<i>Lc. lactis</i> DSM 20481	0	0
<i>L. monocytogenes</i> CIP 82110 <sup>T</sup>	4,0 ± 1,0	1,5 ± 0,5
<i>L. ivanovii</i> CIP 12510	6,08 ± 0,8	3,0 ± 1,0

(\*) : Diamètre des zones d'inhibition (mm). Moyenne de trois essais indépendants.

### III.3.2. Identification des bactériocines produites par *C. maltaromaticum* LMA 28

La recherche des gènes, impliqués dans la production des bactériocines produites par *C. maltaromaticum* LMA 28, a révélé la présence des carnobactériocines BM1 et B2 (Figure 15).



**Figure 15:** Gel d'électrophorèse des amplifiats de séquences de gènes codant pour les bactériocines BM1 et B2

(Pistes 1 et 2) : carnobactériocines BM1 et B2 de *C. maltaromaticum* 5, témoin positif ; (pistes 3 et 5) : eau, témoin négatif ; (pistes 4 et 6) carnobactériocines BM1 et B2 de *C. maltaromaticum* LMA 28 ; (M) : marqueur de taille (Eurogentec)

La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 possède les deux carnobactériocines déjà mises en évidence chez *C. maltaromaticum* LV17 2855 (Quadri *et al.*, 1994). Il serait intéressant de comparer les spectres d'activité des surnageants de culture de *C. maltaromaticum* LMA 28 avec celles de *C. maltaromaticum* LV17 2855, de séquencer les peptides biocides produits par *C. maltaromaticum* LMA 28 afin d'envisager l'éventualité d'une synthèse chimique. Il serait aussi intéressant de rechercher la production, par *C. maltaromaticum* LMA 28 des autres bactériocines déjà identifiées chez l'espèce *C. maltaromaticum*, notamment la piscicoline produite par *C. maltaromaticum* JG126, et la carnocine, produite par *C. maltaromaticum* 5 (Mathieu *et al.*, 1993).

➤ Un milieu de numération sélectif pour l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum* (*C. piscicola*) a été mis au point. Ce milieu contient trois antibiotiques, vancomycine, gentamicine et acide nalidixique, dont les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à l'aide d'un plan d'expériences. Différentes souches d'intérêt, d'altération ou pathogènes ont été retenues comme souches-tests. La composition de ce milieu, (TSA- YE, pH 8,8, 3,5 mg.L<sup>-1</sup> de vancomycine, 5 mg.L<sup>-1</sup> de gentamicine et 20 mg.L<sup>-1</sup> d'acide nalidixique) permet la numération sélective de *C. maltaromaticum* (LMA 28, « Réo » et DSM 20730<sup>T</sup>), de *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup> et de *Desemzia incerta* CIP 104227 au sein de communautés bactériennes complexes présentes dans des matrices alimentaires, notamment de fromages. Les souches *Listeria monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, *Pseudomonas fluorescens* CIP 104227, *Escherichia coli* CIP 54.2 et les levains lactiques commerciaux *Flora Danica*<sup>®</sup> sont fortement inhibés. La souche *Enterococcus faecalis* CIP 76117 est partiellement inhibée avec une diminution de la population de 5 log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>. Ce milieu a ensuite été validé comme milieu de numération, notamment pour la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 vis-à-vis de laquelle il n'exerce aucune inhibition significative. Sous forme de bouillon, ce milieu pourrait être retenu lors d'une étape de pré-enrichissement afin de sélectionner *C. maltaromaticum*, *C. mobile* ou *D. incerta* à partir de différentes matrices alimentaires, notamment de fromages. Comparativement au milieu CTSI proposé par Wasney *et al.* en 2002, ce milieu dénommé CM (pour *C. maltaromaticum*) offre une grande facilité de préparation et d'observation des colonies dont la numération peut être automatisée après un temps d'incubation de 48 h à 25 °C. L'identification géotypique de *Carnobacterium sp.* est possible par PCR avec le couple d'amorces Cb1-Cb2R. L'identification de l'espèce *C. maltaromaticum* avec l'utilisation du couple d'amorces Cpis-23S-7 spécifique à cette espèce décrite par Rachman *et al.* (2004), a donné des amplifiats. En modifiant les conditions de PCR, notamment la concentration en MgCl<sub>2</sub>, une bande de 600 pb est détectée pour des concentrations supérieures à 2 mM. Cette étude a permis de montrer que *C. maltaromaticum* est la seule espèce dans le genre *Carnobacterium* présente dans 10 des 30 fromages français dont 8 AOC.

## **Chapitre IV : Métabolisme fermentaire**



## IV.1. METABOLISME GLUCIDIQUE

IV1.1. Profils carbonés de *C. maltaromaticum* LMA 28, *C. maltaromaticum* «Réo», *C. maltaromaticum* «Pérail», *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> sur galeries API 50 CHL

Le but de cette étude est d'évaluer la capacité de quatre souches de *C. maltaromaticum* à métaboliser des glucides. Les quatre souches de *C. maltaromaticum* (LMA 28, « Réo », « Pérail » et DSM 20730<sup>T</sup>) sont capables d'utiliser le glycérol, le ribose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, le mannitol, l' $\alpha$ -méthyl-D-mannoside, la N-acétyl-glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, l'esculine, la salicine, le cellobiose, le maltose, le lactose, le saccharose, le thréhalose et le gluconate. Le ribose, seul pentose fermenté, avait été retenu dans le milieu de dénombrement semi-sélectif EBRER (Millière et Lefebvre, 1994).

L'hydrolyse du lactose par ces quatre souches confirme l'existence d'une  $\beta$ -galactosidase visualisée par le test à l'ortho-nitro-phényl-galactopyranoside (ONPG). Elles sont donc capables de se développer dans le lait en produisant de l'acide lactique.

Ces quatre souches sont incapables d'utiliser le galactose, l'érythritol, le D-arabinose, le L-arabinose, le D-xylose, le L-xylose, l'adonitol, le  $\beta$ -méthyl-xyloside, le L-sorbose, le rhamnose, le dulcitol, l'inositol, le sorbitol, le mélibiose, l'inuline, le D-lyxose, le D-tagatose, le D-arabitol, le 2-céto-gluconate et le 5-céto-gluconate.

Avec ces quatre souches, différents profils sont obtenus en fonction des réponses avec l' $\alpha$ -méthyl-D-glucoside, l'amidon, le  $\beta$ -gentiobiose et le D-turanose. La proposition d'une mini-galerie pouvant les discriminer est donnée dans le tableau 25.

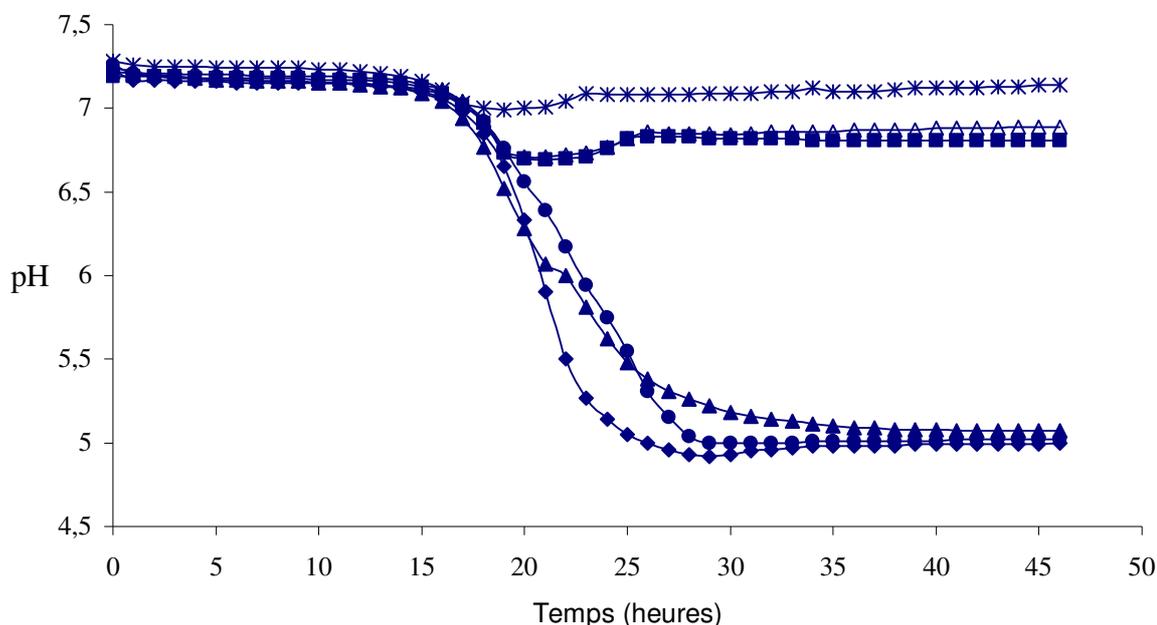
**Tableau 25:** Profils glucidiques de quatre souches de *C. maltaromaticum* à 30 °C pendant 48 h

Glucides	<i>C. maltaromaticum</i>			
	DSM 20730 <sup>T</sup>	LMA 28	«Réo»	«Pérail»
Galactose	w	w	-	-
$\alpha$ -Méthyl-D-glucoside	+	-	-	-
Amidon	-	-	+	-
$\beta$ -Gentiobiose	+	+	+	-
D-Turanose	+	-	+	-

(w) : weak, très faible ; (+) : positif ; (-) : négatif

### IV.1.2. Cinétiques d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE

La cinétique d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 a été analysée sur différents milieux de culture, TSB, TSB-YE sans glucide ou supplémenté avec 2,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose, de lactose, de galactose ou de saccharose. Les préadaptations de la souche sur TSB-YE glucose ou sur TSB-YE lactose, par deux cultures successives, ne permettent pas d'observer de différences significatives dans les cinétiques d'acidification réalisées ensuite sur glucose et/ou sur lactose. Pour une population bactérienne initiale, dans tous les échantillons, de 2,9.10<sup>3</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>, l'acidification ne débute qu'après 16 h de culture à 30 °C (Figure 16).



**Figure 16:** Acidification du bouillon TSB-YE supplémenté ou non avec différents glucides par *C. maltaromaticum* LMA 28 préadapté au glucose (ou au lactose) à 30 °C

Inoculation de 2,9.10<sup>3</sup> ufc.mL<sup>-1</sup> à l'aide d'une préculture de 24 h en TSB-YE reconstitué ; (\*) : TSB sans glucide ; (Δ) : TSB-YE sans glucide ; (▲) : TSB-YE avec 2,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose ; (●) : avec 2,5 g.L<sup>-1</sup> de lactose ; (■) : avec 2,5 g.L<sup>-1</sup> de galactose ; (◆) : avec 2,5 g.L<sup>-1</sup> de saccharose. Ces résultats sont la moyenne de 4 essais indépendants, écart type ≤ 0,05.

En TSB sans glucide, le pH varie peu, passant de 7,3 à 7,0 après 46 h d'incubation. En TSB-YE sans glucide, le pH final est de 6,7. En fin d'incubation, la population bactérienne était de 2,7.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup> dans le TSB sans glucide et de 3,3.10<sup>8</sup> ufc.mL<sup>-1</sup> dans le TSB-YE. Cette souche pousse sur milieu TSB en absence de sucre, puisque la population augmente d'environ 4 log<sub>10</sub> en 46 h mais sans acidification notable. L'ajout de 6 g.L<sup>-1</sup> de YE au

bouillon TSB augmente la population finale d'un  $\log_{10}$  supplémentaire et provoque une acidification de seulement 0,3 unité pH.

En TSB-YE, le galactose est très faiblement métabolisé, avec un abaissement de pH de seulement 0,1 unité après 46 h d'incubation. Ce résultat confirme celui observé sur galerie API 50 CHL, avec une acidification très faible n'apparaissant que très tardivement (72 h d'incubation). Cette souche est donc incapable de fermenter le galactose. La recherche d'une galactose-1-phosphate-uridyl transférase, lui permettant de transformer le galactose-1-phosphate en glucose-1-phosphate, n'a pas été entreprise.

En revanche, en présence de glucose, de lactose ou de saccharose, cette souche acidifie le bouillon TSB-YE jusqu'à une valeur finale de pH de 5,0 en 46 h d'incubation, avec des niveaux de population comparables, respectivement de  $3,6 \cdot 10^9$ , de  $3,2 \cdot 10^9$  ou de  $3,7 \cdot 10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>. La présence de glucides métabolisables permet une augmentation supplémentaire d'environ 1  $\log_{10}$  de la population bactérienne par rapport à celle en TSB-YE sans glucide ou en TSB-YE supplémenté avec le galactose et de 2  $\log_{10}$  par rapport à celle en TSB. Avec ces trois substrats carbonés, la valeur de  $V_{\max}$  est de 0,25 (glucose), 0,24 (lactose) et 0,43 (saccharose) unité de pH.h<sup>-1</sup>. Ainsi,  $T_{\max}$ , correspondant à  $V_{\max}$ , est respectivement de 18, de 25 et de 20 h et le  $\text{pH}_{\max}$ , correspondant à  $V_{\max}$ , est respectivement de 6,7, 5,6 et de 6,3.

Comme les résultats précédents l'indiquent, la cinétique d'acidification la plus rapide est observée en présence de saccharose ; cette souche est capable de fermenter le fructose. Elle est plus lente en présence de lactose, puisque la valeur de pH 5,5 est atteinte en 25 h contre 22 h en présence de saccharose. En TSB-YE supplémenté avec du glucose, les résultats sont reproductibles et difficilement interprétables ; ce glucide est tout d'abord le plus rapidement fermenté, comme observé entre 17 et 20 h d'incubation ; à 21 h, correspondant à une valeur de pH d'environ 6,0, l'acidification est brusquement freinée puis repart mais avec une vitesse plus faible (0,20 unité pH.h<sup>-1</sup>) que celle observée en présence de lactose. Avec le glucose, le ralentissement de l'acidification est ensuite observé pour une valeur de pH de 5,2, valeur supérieure à celles des deux autres cultures (pH 5,0), réalisées en présence de lactose ou de saccharose.

### IV.1.3. Dosage du glucose, du galactose, du fructose, du lactose et de l'acide lactique

L'absence de fermentation du galactose par certaines bactéries lactiques est un paramètre important en fromagerie en raison du phénomène de post-acidification, souvent à l'origine de défauts créés par des souches microbiennes métabolisant cet hexose. En effet, le galactose accumulé dans le milieu par des souches galactose-négatives, comme *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, peut être le substrat de micro-organismes capables de le métaboliser, ce qui modifie la vitesse d'affinage et la qualité des produits laitiers obtenus. Afin de comparer le métabolisme glucidique de *C. maltaromaticum* LMA 28 avec celui de *S. thermophilus* INRA 302, souche connue pour être galactose-négative et excréter le galactose issu de l'hydrolyse du lactose dans le milieu extracellulaire, les déterminations des concentrations en glucides et en acide lactique ont été réalisées en TSB-YE modifié en substituant ou non le glucose par 5 g.L<sup>-1</sup> de lactose, de fructose ou de galactose.

#### IV.1.3.1. *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28

Le tableau 26 rapporte les résultats de la consommation des glucides et de la production d'acide lactique, par *C. maltaromaticum* LMA 28, en TSB-YE pendant 25 h à 30 °C.

- **fermentation du glucose** : en 20 h d'incubation à 30 °C, la fermentation du glucose est très faible avec seulement 4,3 mM de glucose métabolisés et la production de 1,7 mM d'acide lactique L(+). Elle est ensuite très rapide jusqu'à 25 h, avec 6,9 mM supplémentaires de glucose fermenté, donnant 6,5 mM d'acide lactique. Le pH final de la culture est de 4,9.

- **hydrolyse du lactose** : dans les mêmes conditions expérimentales, cette souche hydrolyse 2,5 mM de lactose en 20 h donnant 1,7 mM d'acide lactique. Seule la fraction glucose est métabolisée. Entre 20 et 25 h d'incubation, 3,3 mM de lactose sont utilisées, quantité également plus faible qu'en présence de glucose seul. La fermentation du glucose, issu du lactose, est moins rapide que celle du glucose seul. Le galactose n'est pas mis en évidence dans le milieu de culture pendant toute l'incubation.

- **fermentation du galactose** : le galactose n'est pas métabolisé. En 25 h d'incubation, la concentration en galactose passe de 25,2 à  $23,6 \pm 0,9$  mM et le pH varie de 7,3 à 6,3. L'acide lactique n'a pas été détecté. L'acidification serait en relation avec la dégradation des sources azotées, car la variation d'une unité de pH correspond à l'acidification observée en milieu TSB-YE sans glucide.

- **fermentation du fructose** : la consommation du fructose est plus rapide que celle du glucose puisqu'en 20 h de culture, 6,1 mM de cet hexose sont utilisés, contre 4,3 mM de glucose. Après 25 h d'incubation, 11,0 mM d'acide lactique L(+) sont produits.

**Tableau 26:** Consommation des glucides et production d'acide lactique par *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE à 30 °C

Temps (h)	glucose (mM)	Ac. lactique L(+) en mM	pH
0	$22,6 \pm 0,6$	0	7,3
5	$22,5 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$	6,9
10	$21,8 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,3$	6,9
15	$20,2 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,9$	6,7
20	$18,3 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,8$	5,8
25	$11,4 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,2$	4,9

(A) : Fermentation du glucose ; moyenne de trois essais indépendants.

Temps (h)	lactose en mM	Ac. lactique L(+) en mM	pH
0	$11,0 \pm 1,8$	0	7,3
5	$10,8 \pm 1,5$	$0,2 \pm 0,1$	6,9
10	$10,5 \pm 1,6$	$0,6 \pm 0,3$	6,9
15	$10,3 \pm 1,4$	$0,8 \pm 0,1$	6,7
20	$8,5 \pm 1,5$	$1,7 \pm 0,1$	5,7
25	$4,8 \pm 0,9$	$8,6 \pm 1,7$	4,9

(B) : hydrolyse du lactose, production d'acide lactique L(+) et absence d'excrétion du galactose ; moyenne de trois essais indépendants.

Temps (h)	fructose (mM)	Ac. lactique L(+) en mM	pH
0	$21,9 \pm 0,6$	0	7,3
5	$21,4 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	6,9
10	$20,9 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,3$	6,9
15	$20,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,6$	6,6
20	$15,8 \pm 0,4$	$2,5 \pm 1,6$	5,5
25	$10,8 \pm 0,4$	$11,0 \pm 1,7$	4,9

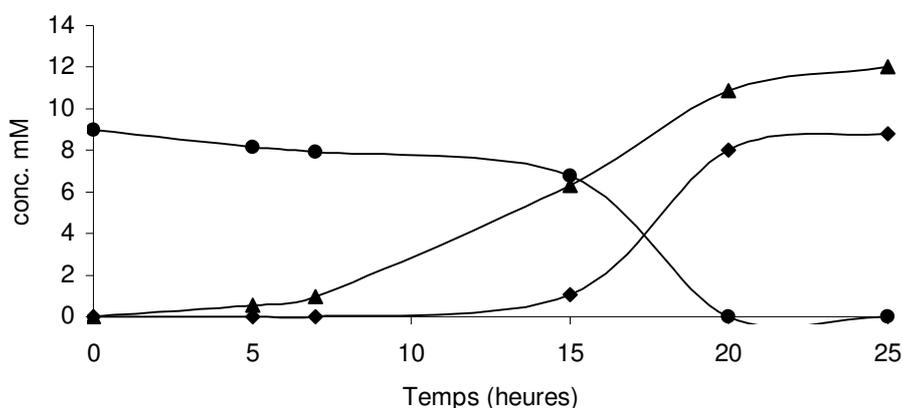
(C) : fermentation du fructose ; moyenne de trois essais indépendants.

L'espèce *S. thermophilus* est retenue dans cette étude en raison de son incapacité à fermenter le galactose. Lors de l'hydrolyse du lactose par la  $\beta$ -galactosidase, cet hexose est excrété dans le milieu de culture en quantité molaire identique à celle du lactose hydrolysé. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 ne fermente pas le galactose et nos résultats ne montrent jamais son excrétion dans le milieu de culture. Afin de contrôler ce résultat, la souche *S. thermophilus* INRA 302 a été retenue comme souche de référence.

#### IV.1.3.2. *Streptococcus thermophilus* INRA 302

Les dosages du lactose, du glucose, du galactose et de l'acide lactique sont effectués lors de la culture de *S. thermophilus* INRA 302 en milieu TSB-YE à 37 °C (Figure 17). L'hydrolyse du lactose se traduit, dans le milieu extérieur, par la présence d'acide lactique et de galactose. Après 20 h d'incubation, le bilan carboné indique que tout le lactose hydrolysé (9 mM) a été transformé en 8,7 mM de galactose et en 12 mM d'acide lactique. L'excrétion du galactose intervient plus tardivement (après 10 h d'incubation) que celle de l'acide lactique (5 h). Le métabolisme de *S. thermophilus* INRA 302 diffère de celui de *C. maltaromaticum* LMA 28.

Pour *C. maltaromaticum* LMA 28, le dosage du galactose, réalisé sur des cellules broyées après 7 jours d'incubation à 30 °C en culture sur TSB-YE lactose, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de galactose éventuellement accumulé dans les cellules.



**Figure 17:** Hydrolyse du lactose, production d'acide lactique et excrétion du galactose par *S. thermophilus* INRA 302 en TSB-YE reconstitué avec 5 g.L<sup>-1</sup> de lactose à 37 °C (●) : hydrolyse du lactose, (◆) : excrétion du galactose ; (▲) : production d'acide lactique L(+). Moyenne de trois essais indépendants, écart type  $\leq 0,3$ .

Le glucose n'est jamais mis en évidence dans les cultures de *S. thermophilus* INRA 302 et de *C. maltaromaticum* LMA 28, car il est immédiatement métabolisé dans la cellule selon la voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas).

➤ La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 est exigeante sur le plan nutritionnel ; elle métabolise le glucose, le saccharose et le lactose. Elle est incapable de fermenter le galactose, mais l'excrétion de cet hexose, suite à l'hydrolyse du lactose, n'est pas observée. *Streptococcus thermophilus* INRA 302, souche lactique également galactose-négative, excrète le galactose suite à l'hydrolyse du lactose. Le métabolisme fermentaire de ces deux souches lactiques galactose-négatives est donc différent. La détermination de leurs profils enzymatiques sera réalisée afin de comparer leurs équipements enzymatiques.

## IV.2.. ACTIVITES ENZYMATIQUES

### IV.2.1. Profil enzymatique

Les kits API ZYM permettent de déterminer rapidement des activités enzymatiques de souches bactériennes à l'aide de substrats non naturels, par modification de la couleur d'un réactif. L'obtention de ces profils enzymatiques permet de comparer les équipements enzymatiques de souches appartenant à la même espèce. Sont retenues dans cette étude les quatre souches de *C. maltaromaticum* (LMA 28, «Réo», «Pérail» et DSM 20730<sup>T</sup>), ainsi que *S. thermophilus* INRA 302 et *Lc. lactis* DSM 20481.

L'observation semi-qualitative des galeries API ZYM, fondée sur l'intensité de la coloration, permet le classement de ces six souches en trois groupes (Tableau 27) :

- Le premier regroupe les quatre souches de *C. maltaromaticum*. Leur profil enzymatique est relativement pauvre, avec seulement la présence d'une estérase (substrat C4), d'une estérase lipase (C8), d'une phosphatase acide, d'une phosphohydrolase, d'une  $\beta$ -glucosidase et d'une N-acétyl- $\beta$ -glucosaminase. Ces quatre souches peuvent être distinguées par une activité lipasique faible, présente uniquement chez *C. maltaromaticum* LMA 28, une activité  $\alpha$ -glucosidasique chez *C. maltaromaticum* « Réo » et *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, l'absence d'activité N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidasique chez *C. maltaromaticum* « Pérail » et *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>. Seule la souche « Pérail » possède une  $\alpha$ -mannosidase et la souche DSM 20730<sup>T</sup> se caractérise par l'absence de  $\beta$ -

glucosidase, enzyme présente chez les trois autres souches. La distinction entre ces quatre souches pourrait aisément être obtenue à partir des tests  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucosidases, N-acétyl-glucosaminidase et  $\alpha$ -mannosidase.

Les trois souches provenant de fromages possèdent un équipement glucidolytique plus important que la souche de collection DSM 20730<sup>T</sup>, isolée d'une truite arc-en-ciel malade.

**Tableau 27:** Profils enzymatiques de six bactéries lactiques par les tests API ZYM

Enzymes	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>				<i>Lc. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>
	LMA 28	«Réo»	«Pérail»	DSM 20730 <sup>T</sup>	DSM 20481	INRA 302
Phosphatase alcaline	-	-	-	-	++	-
Estérase (C4)	++	+	++	++	++	+
Estérase lipase (C8)	++	+	++	++	++	-
Lipase (C14)	+	-	-	-	+	-
Leucine arylamidase	-	-	-	-	++++	++++
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-	++	-
Trypsine	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -chymotrypsine	-	-	-	-	++++	-
Phosphatase acide	+++	++	+++	+++	++++	-
Naphtol-AS-BI-	+++	+++	+++	+++	+++	+
$\alpha$ -galactosidase	+	-	-	-	+	-
$\beta$ -galactosidase	-	-	-	-	+	++++
$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	+	-
$\alpha$ -glucosidase	-	++	-	++++	++++	-
$\beta$ -glucosidase	++++	++++	++++	-	++++	+
N-acétyl- $\beta$ -	++++	++++	-	-	-	+
$\alpha$ -mannosidase	-	-	++++	-	-	-
$\alpha$ -fucosidase	-	-	-	-	-	-

(+) : faible activité enzymatique ; (++) : activité enzymatique moyenne ; (+++) : activité enzymatique forte ; (++++) : activité enzymatique très forte.

- Le deuxième groupe est formé par la souche *Lc. lactis* DSM 20481, souche lactique de référence dans notre étude, possède un équipement enzymatique plus complexe, notamment par la présence d'activités phosphatasique (phosphatase alcaline),  $\alpha$ -chymotrypsine, leucyl-arylamidasique et  $\beta$ -galactosidasique.

- La souche *S. thermophilus* INRA 302 constitue le troisième groupe ; elle est peu active sur les esters et les lipides et montre de fortes activités leucyl-arylamidasique et  $\beta$ -galactosidasique.

Pour l'hydrolyse du lactose chez *C. maltaromaticum*, il est intéressant d'observer des différences de réponses entre l'acidification du TSB-YE additionné de lactose, la galerie API 50 CHL et la galerie API ZYM. Sur la galerie API ZYM, la sensibilité au test  $\beta$ -galactosidase n'est pas élevée, car aucune des quatre souches de *C. maltaromaticum* ne posséderait cette enzyme, cependant mise en évidence par le test à l'ONPG, par l'hydrolyse lente du lactose sur galeries API 50 CHL et par l'acidification du TSB-YE additionné de lactose.

#### IV.2.2. Activité lipolytique

Sur milieu au bleu de Nil, contenant de la matière grasse laitière, les cinq souches testées (*C. maltaromaticum* LMA 28, *E. faecalis* CIP 76117, *S. thermophilus* INRA 302, *Lc. lactis* DSM 20481 et *Ps. fluorescens* CIP 6913) donnent des résultats très différents (Tableau 28). Seule la souche Gram-négative *Ps. fluorescens* CIP 6913 hydrolyse fortement ce substrat. Les quatre autres souches, dont *C. maltaromaticum* LMA 28, ont une activité lipolytique faible, résultat déjà connu chez les bactéries lactiques.

**Tableau 28:** Activités lipolytique et protéolytique de *Ps. fluorescens* CIP 6913, *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481, *S. thermophilus* INRA 302 et *E. faecalis* CIP 76117 à 30 ou à 37 °C, selon la température optimale de croissance de la souche, sur milieu au bleu de Nil ou sur gélose au lait

Souches	Activités enzymatiques	
	Lipolyse <sup>a</sup>	Protéolyse <sup>b</sup>
<i>Ps. fluorescens</i> CIP 6913	38*	27
<i>C. maltaromaticum</i> LMA 28	11	8
<i>Lc. lactis</i> DSM 20481	10	14
<i>S. thermophilus</i> INRA 302	11	6
<i>E. faecalis</i> CIP 76117	9	7

(\*) : Diamètres de la zone d'inhibition en mm ; (a) : gélose au bleu de Nil, (b) : gélose au lait. Le diamètre de la zone d'activité correspond au diamètre de la zone d'hydrolyse moins celui de la colonie. Moyenne de trois essais indépendants, écart type  $\leq 1,0$  mm

La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 hydrolyse donc les triglycérides en libérant des acides gras et en formant du glycérol et des mono et des diglycérides. La caractérisation des enzymes lipolytiques n'a pas été réalisée, ni les conditions (température, pH, substrats) permettant d'analyser leur activité.

#### IV.2.3. Activité protéolytique (caséinolytique)

Sur le milieu gélose au lait, la souche *Ps. fluorescens* CIP 6913 est également la plus active, avec une transparisation totale de la zone entourant la piqûre. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 possède une activité comparable à celle d'*E. faecalis* CIP 76117 et de *S. thermophilus* INRA 302, tandis que celle de *Lc. lactis* DSM 20481 est plus importante (Tableau 28). Dans nos conditions expérimentales, les activités lipolytique et protéolytique de *C. maltaromaticum* LMA 28 sont donc équivalentes à celles des autres bactéries lactiques testées.

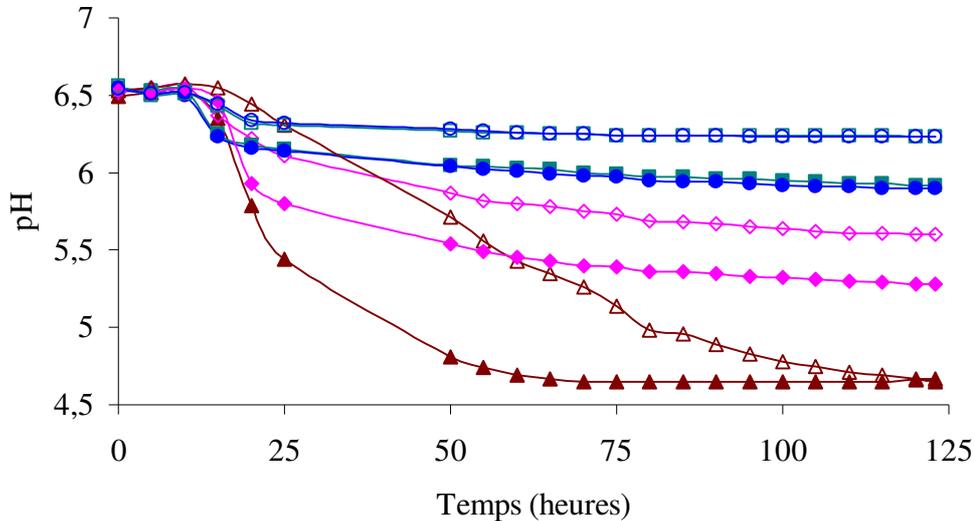
➤ La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 possède un équipement enzymatique différent de ceux de *Lc. lactis* DSM 20481 et de *S. thermophilus* INRA 302. L'activité  $\beta$ -galactosidasique visualisée par le test à l'ONPG et par l'acidification du TSB-YE additionné de lactose devrait permettre à *C. maltaromaticum* LMA 28 de se développer dans le lait. Afin d'étudier ses capacités acidifiantes dans le lait, sa cinétique d'acidification sera d'abord comparée avec celles de trois autres souches de *C. maltaromaticum*, ensuite avec celles de *Lc. lactis* DSM 20481 et de *S. thermophilus* INRA 302.

### IV.3. CINÉTIQUES D'ACIDIFICATION DANS DU LAIT

#### IV.1. Comparaison du profil d'acidification des quatre souches de *C. maltaromaticum*

En culture sur lait UHT stérilisé, *C. maltaromaticum* « Réo » et *C. maltaromaticum* « Pérail » montrent des cinétiques d'acidification similaires (Figure 18). Ces deux souches hydrolysent très lentement le lactose puisqu'après 100 h d'incubation à 30 °C, la variation de pH est seulement de 0,3 unité. La souche *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, également

lente, est cependant significativement plus active avec 0,9 unité de variation de pH. Seule *C. maltaromaticum* LMA 28 possède l'activité  $\beta$ -galactosidasique la plus importante, puisqu'après 100 h, la diminution de la valeur de pH atteint 1,8 unité.



**Figure 18:** Cinétique d'acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé, supplémenté ou non avec  $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure, par quatre souches de *C. maltaromaticum*

Population initiale de  $1.10^4 \text{ ufc.mL}^{-1}$  à l'aide d'une préculture de 24 h en TSB-YE reconstitué avec du lactose. (○) : lait acidifié par *C. maltaromaticum* «Réo»; (●) : lait-YE acidifié par *C. maltaromaticum* «Réo»; (□) : lait + *C. maltaromaticum* «Pérail»; (■) : lait-YE + *C. maltaromaticum* «Pérail»; (◇) : lait + *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>; (◆) : lait-YE + *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>; (△) : lait + *C. maltaromaticum* LMA 28; (▲) : lait-YE + *C. maltaromaticum* LMA 28. Moyenne de trois essais indépendants, écart type  $\leq 0,05$

L'addition d' $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure (YE) au lait stimule faiblement les trois souches de *C. maltaromaticum* («Réo», «Pérail» et DSM 20730<sup>T</sup>) en diminuant la valeur de pH d'environ 0,3 unité avec une vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) de  $0,05 \text{ unité pH.h}^{-1}$  après 10 h d'incubation à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , sans coagulation du lait après 125 h d'incubation. Cet ajout d'YE est surtout favorable au métabolisme carboné de *C. maltaromaticum* LMA 28, car une  $V_{\text{max}}$  de  $0,11 \text{ unité pH.h}^{-1}$  est atteinte dès 15 h d'incubation, avec des valeurs de pH respectivement de 6,3 ou de 5,4 en absence ou en présence d' $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure. Pour cette souche, la coagulation du lait (pH 4,9) est observée en 38 h en présence d'extrait de levure, mais seulement en 76 h dans le lait témoin. Le pH final de la culture, après 125 h d'incubation, est de 4,7.

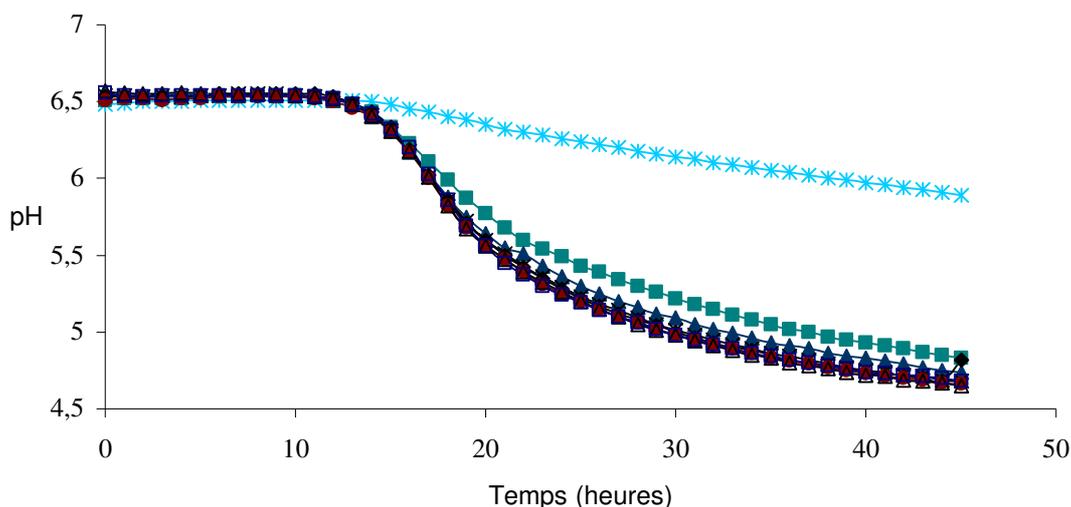
Au sein de l'espèce *C. maltaromaticum*, les quatre souches, dont 3 issues de fromages montrent des performances acidifiantes différentes. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28

possède l'activité  $\beta$ -galactosidase la plus importante, elle est donc la plus adaptée au substrat lait.

#### IV.3.2. Cinétique d'acidification du lait par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la concentration en extrait de levure

Le pH du lait non supplémenté en extrait de levure et ensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 a peu varié (0,6 unité après 45 h à 30 °C) (Figure 19). De ce fait, les paramètres  $V_{\max}$  et  $T_{\max}$  ne peuvent pas être déterminés. Suite à l'ajout d'1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, le pH diminue de 1,8 unité, la  $V_{\max}$  est de 0,12 unité pH.h<sup>-1</sup> et le  $T_{\max}$  de 18 h. Le lait est donc un substrat nutritionnellement non adapté à la croissance optimale de *C. maltaromaticum* LMA 28. Cette souche lente et exigeante nécessiterait de métaboliser des substrats facilement assimilables, comme l'extrait de levure, pour lui permettre une croissance plus rapide.

L'ajout de 2 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure n'entraîne pas une acidification supplémentaire, car la variation de pH est toujours de 1,8 unité, la  $V_{\max}$  de 0,13 unité pH.h<sup>-1</sup> et le  $T_{\max}$  de 18 h. Les concentrations supérieures, entre 2 et 10 g.L<sup>-1</sup>, donnent des résultats quasi similaires. La concentration en extrait de levure nécessaire pour améliorer significativement les performances acidifiantes de cette souche est donc de 1 g.L<sup>-1</sup>.

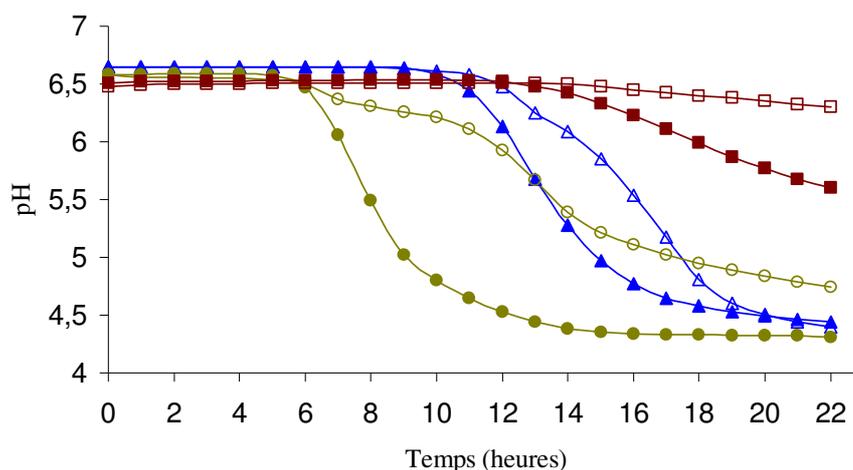


**Figure 19:** Acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la concentration en extrait de levure à 30 °C

Inoculation de  $2,9 \cdot 10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 24 h en TSB-YE reconstitué avec du glucose. (\*): Lait ; (■): lait additionné de 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (YE) ; (▲): lait + 2 g.L<sup>-1</sup> YE ; (○): lait + 3 g.L<sup>-1</sup> YE ; (◆): lait + 4 g.L<sup>-1</sup> YE ; (●): lait + 5 g.L<sup>-1</sup> YE ; (Δ): lait + 6 g.L<sup>-1</sup> YE ; (□): lait + 10 g.L<sup>-1</sup> YE. Moyenne de trois essais indépendants, écart type  $\leq 0,07$

### IV.3.3. Comparaison du profil d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28, de *S. thermophilus* INRA 302 et de *Lc. lactis* DSM 20481

La figure 20 rapporte les profils d'acidification des laits UHT stérilisés, supplémentés ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. Les paramètres cinétiques de ces trois bactéries lactiques sont donnés dans le tableau 29.



**Figure 20:** Profils d'acidification du lait UHT demi-écrémé stérilisé supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par trois souches lactiques

(□) : lait ensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C (inoculation de  $2,9 \cdot 10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 16 h en TSB-YE) ; (■) : lait-YE + *C. maltaromaticum* LMA 28 ; (△) : Lait ensemencé avec *Lc. lactis* DSM 20481 à 30 °C ; (inoculation de  $6,4 \cdot 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 16 h sur lait) ; (▲) : lait-YE + *Lc. lactis* DSM 20481 ; (○) lait ensemencé avec *S. thermophilus* INRA 302 à 37 °C ; (inoculation de  $5,8 \cdot 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 16 h en TSB-YE) ; (●) : Lait-YE + *S. thermophilus* INRA 302. Moyenne de trois essais indépendants,  $\leq 0,07$

Dans les laits non supplémentés en YE, les vitesses maximales d'acidification sont respectivement de 0,0, 0,28 et 0,23 unité de pH.h<sup>-1</sup> pour *C. maltaromaticum* LMA 28, *S. thermophilus* INRA 302 et pour *Lc. lactis* DSM 20481. Les valeurs de T<sub>max</sub> sont non déterminées pour *C. maltaromaticum* LMA 28 et respectivement de 13 et 17 h *S. thermophilus* INRA 302 et pour *Lc. lactis* DSM 20481. Avec l'ajout d'1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, les V<sub>max</sub> sont respectivement de 0,12, 0,57 et 0,46 unité pH.h<sup>-1</sup>, avec des T<sub>max</sub> de 18, 7,0 et 12 h. Cette addition d'extrait de levure améliore donc significativement les performances d'acidification de ces trois souches tests.

Cependant, même en présence d'extrait de levure, *C. maltaromaticum* LMA 28 reste la souche la plus lente.

Dans les laits non supplémentés en extrait de levure, le pH à 22 h d'incubation à 30 °C (arrêt de la culture) est de 6,3 pour *C. maltaromaticum* LMA 28, de 4,7 pour *S. thermophilus* INRA 302 et de 4,4 pour *Lc. lactis* DSM 20481. Dans les laits supplémentés en extrait de levure, ces valeurs sont respectivement 5,6, 4,3 et 4,4. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 apparaît donc comme peu acidifiante et essentiellement lente.

**Tableau 29:** Effet de l'addition d'extrait de levure dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé sur la cinétique d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28, de *Lc. lactis* DSM 20481 à 30 °C et de *S. thermophilus* INRA 302 à 37 °C

Milieux	Souches bactériennes	V <sub>max</sub> (pH.h <sup>-1</sup> )	T <sub>max</sub> (h)	pH <sub>f</sub>
Lait	<i>C. maltaromaticum</i> LMA	ND	ND	6,3
	<i>S. thermophilus</i> INRA 302	0,28	13	4,7
	<i>Lc. lactis</i> DSM 20481	0,23	17	4,4
Lait-YE	<i>C. maltaromaticum</i> LMA	0,12	18	5,6
	<i>S. thermophilus</i> INRA 302	0,57	7	4,3
	<i>Lc. lactis</i> DSM 20481	0,46	12	4,4

(V<sub>max</sub>) : Vitesse maximale d'acidification en unité de pH par heure ; (T<sub>max</sub>) : Temps correspondant à V<sub>max</sub> en heure ; pH<sub>f</sub> : pH obtenu en fin d'incubation ; ND : non déterminé.

#### IV.3.4. Cinétique d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la charge bactérienne initiale

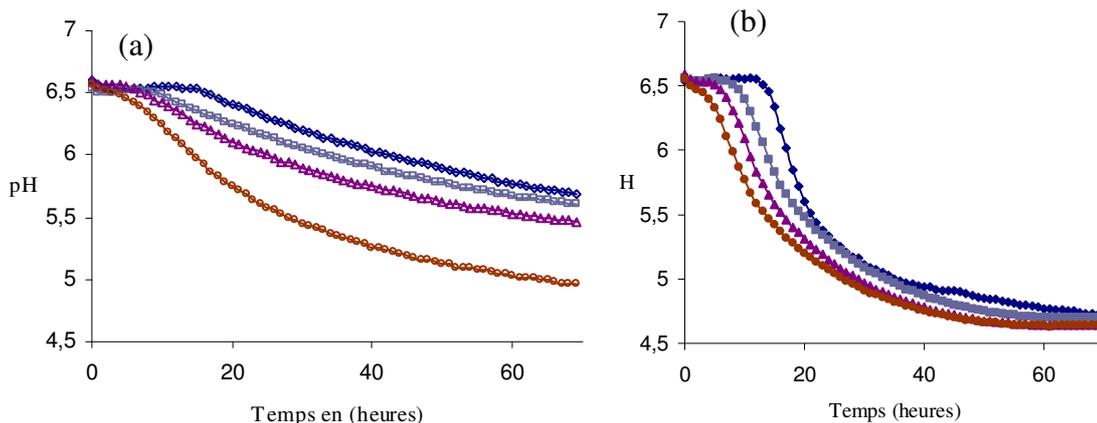
##### IV.3.4.1. Dans le lait

Le niveau de population en *C. maltaromaticum* LMA 28 joue un rôle important sur la cinétique d'acidification du lait. Plus elle est élevée, plus l'acidification intervient rapidement (Figure 21a). Pour une durée d'incubation donnée, la valeur du pH est d'autant plus basse que la biomasse cellulaire initiale est élevée. Une différence importante dans les valeurs de pH est observée entre les cultures réalisées avec  $3,2 \cdot 10^3$  et  $3,2 \cdot 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Dans nos conditions expérimentales, seule la concentration  $3,2 \cdot 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup> permet la coagulation du lait en 44 h à 30 °C. Sur le plan technologique, une biomasse équivalente devrait être retenue. Cependant, des concentrations plus importantes pourraient être

envisagées, mais sans surcoût excessif, afin de supprimer l'addition d'extrait de levure, uniquement utilisable dans le cadre d'expérimentations réalisées au laboratoire.

#### IV.3.4.2. Dans le lait supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure

Comme attendu, la biomasse initiale en *C. maltaromaticum* LMA 28 modifie de façon importante la cinétique d'acidification (Figure 21b).



**Figure 21:** Acidification du lait UHT stérilisé supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la charge bactérienne initiale, à 30 °C

Inoculation d'une préculture de 24 h sur TSB-YE avec du glucose. (a) : lait ; (◇) : ensemencé avec 3,2.10<sup>3</sup>; (□) : 3,2.10<sup>5</sup>; (△) : 3,2.10<sup>6</sup>; (○) : 3,2.10<sup>7</sup>; (b) ; lait-YE ; (◆) : 3,2.10<sup>3</sup>; (■) : 3,2.10<sup>5</sup>; (▲) : 3,2.10<sup>6</sup>; (●) : 3,2.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>. Moyenne de trois essais indépendants, écart type ≤ 0,1

L'abaissement du pH intervient d'autant plus rapidement que la biomasse est plus importante. Après ensemencement du lait à différents niveaux de population, les changements de pente sont notés après 15 h (3,2.10<sup>3</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>), 8 h (3,2.10<sup>4</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>), 3 h (3,2.10<sup>6</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>) ou dès l'inoculation de la souche (3,2.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>). Les valeurs de  $V_{max}$  varient entre 0,17 et 0,13 unité pH.h<sup>-1</sup> et les  $T_{max}$  sont respectivement de 16, 13, 10 et 6 h. La durée nécessaire pour la coagulation du lait est également modifiée avec une diminution de 40 h lorsque la population initiale passe de 3,2.10<sup>3</sup> à 3,2.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>.

En technologie fromagère, la participation de cette souche, lors de la coagulation, dépendra à la fois de sa population initiale et de son pourcentage dans des cocktails de souches plus acidifiantes. Il s'avère donc indispensable de l'utiliser à des niveaux très élevés (1.10<sup>8</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>), valeur de 10 à 100 fois plus élevée que celle des autres flores lactiques.

Au laboratoire, le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques est la plupart du temps mesuré à leur température optimale de croissance. En technologie fromagère, les paramètres pH et températures du lait évoluent constamment. Les bactéries lactiques sont ainsi soumises à des modifications permanentes de leur activité biologique qui est rarement optimale. Il s'avère donc nécessaire d'étudier leur comportement dans des conditions qui simulent les différentes étapes de la technologie utilisée.

#### **IV.3.5. Impact de la combinaison pH-température sur la cinétique d'acidification du lait-YE par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302**

Les cinétiques d'acidification du lait UHT stérilisé supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (lait-YE) ont été analysées par la détermination des paramètres  $V_{\max}$  et  $T_{\max}$ . Ces essais ont été réalisés par deux plans d'expériences établis selon la matrice de Doehlert. L'un a été effectué à des températures « chaudes », comprises entre 23 et 37 °C pour les trois bactéries lactiques. L'autre a été réalisé à des températures « froides » entre 3 et 23 °C dans une gamme de pH variant de 5,20 (fin d'égouttage) à 8,00 (fromage très affiné), uniquement pour *C. maltaromaticum* LMA 28.

##### **IV.3.5.1. Températures « chaudes »**

Pour le premier plan d'expériences, entre 23 et 37 °C, les valeurs des paramètres  $V_{\max}$  et  $T_{\max}$  sont rapportées dans le tableau 30. Ces valeurs doivent permettre de confirmer les caractères « thermophile » de la souche *S. thermophilus* INRA 302, mésophile de *Lc. lactis* DSM 20481 et psychrotrophe de *C. maltaromaticum* LMA 28 et d'étudier leur comportement sur des gammes étendues de pH et de températures. Le classement des souches lactiques en souches lentes ou en souches rapides est un paramètre très important en fromagerie. De plus, toute modification de température ou de pH, lors des différentes étapes de la fabrication fromagère, joue sur l'activité des flores microbiennes et entraîne des modifications dans les successions de ces différentes flores. Dans nos essais, le lait a été additionné d'extrait de levure (1 g.L<sup>-1</sup>), afin de permettre une croissance plus rapide de *C. maltaromaticum* LMA 28 et une acidification plus intense du lait jusqu'à sa coagulation.

**Tableau 30:** Paramètres cinétiques obtenus à l'aide du plan d'expériences des « températures chaudes » (réponses expérimentales <sup>a</sup>)

N° exp	conditions		Paramètres cinétiques					
			V <sub>max</sub>			T <sub>max</sub>		
	pH	θ (°C)	C	S	L	C	S	L
1	8,0	30	0,20	0,45	0,55	18	58	10
2	5,2	30	0,02	0,11	0,22	35	30	10
3	7,3	37	0,08	0,88	0,67	53	7	9
4	5,9	23	0,05	0,11	0,20	25	53	16
5	7,3	23	0,13	0,25	0,41	25	55	17
6	5,9	37	0,00	0,43	0,36	66	7	9
7	6,6	30	0,13	0,35	0,45	19	16	9
8	6,6	30	0,13	0,37	0,48	19	16	9

(a): paramètres cinétiques d'acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec 1g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure ; V<sub>max</sub> : vitesse maximale d'acidification en unité de pH par heure ; T<sub>max</sub> : temps nécessaire pour atteindre V<sub>max</sub> en heure ; (C) : *C. maltaromaticum* LMA 28 ; (S) : *S. thermophilus* INRA 302 ; (L): *Lc. lactis* DSM 20481

La valeur de V<sub>max</sub> traduit la vitesse maximale d'acidification du lait qui est atteinte après la durée T<sub>max</sub>. Une fois atteinte, la vitesse (V) diminue en raison de l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur le métabolisme de la souche productrice. La durée T<sub>max</sub> englobe la période d'adaptation de la souche pendant laquelle aucune variation significative de la valeur de pH n'est observée ( $\Delta\text{pH} < 0,5$  unité) (Corrieu *et al.*, 1988). Ces durées d'adaptation ont été également analysées par le logiciel Nemrod<sup>®</sup>, mais les résultats obtenus donnent les mêmes informations que celles fournies par le paramètre T<sub>max</sub>.

#### \* La souche *S. thermophilus* INRA 302

Cette souche « thermophile » n'a pas été étudiée à sa température optimale de croissance, entre 39 et 41 °C, mais à des températures plus basses. Dans les gammes de températures entre 23 et 37 °C et de pH entre 5,20 et 8,00, la valeur de V<sub>max</sub> pour sept expérimentations (la dernière a été reproduite une seule fois) varie entre 0,11 (pH 5,20 - 23 °C) et 0,88 unité pH.h<sup>-1</sup> (pH 7,30 - 37 °C) (Tableau 30).

La température élevée et un pH initial proche de la neutralité favorisent la croissance et la production d'acide lactique. La valeur de  $T_{max}$  la plus petite, 7 h, est observée pour les associations pH 5,90 - 37 °C et pH 7,30 - 37 °C, en relation avec le caractère « thermophile » de cette souche. En revanche cette valeur est huit fois plus élevée que celle observée dans des conditions défavorables (pH 8,00 - 30 °C) ou à 23 °C à pH 5,90 ou à pH 7,30. L'exploitation des valeurs  $V_{max}$  et  $T_{max}$  a permis d'analyser globalement les performances acidifiantes de cette souche. Les coefficients des modèles quadratiques pour les deux variables pH et température sont rapportés dans le tableau 31 et les courbes d'isoréponses de  $V_{max}$  et de  $T_{max}$  dans la figure 22.

Dans le domaine expérimental, l'équation qui prédit la variation de  $V_{max}$ , par rapport au centre du domaine, indique que l'augmentation des valeurs de pH ( $b_1 = 0,272$ ) et de la température d'incubation ( $b_2 = 0,274$ ) augmente la valeur de  $V_{max}$ . La diminution du paramètre  $T_{max}$  est obtenue en augmentant la température (-27,135) et en diminuant la valeur du pH (9,667) (Tableau 31).

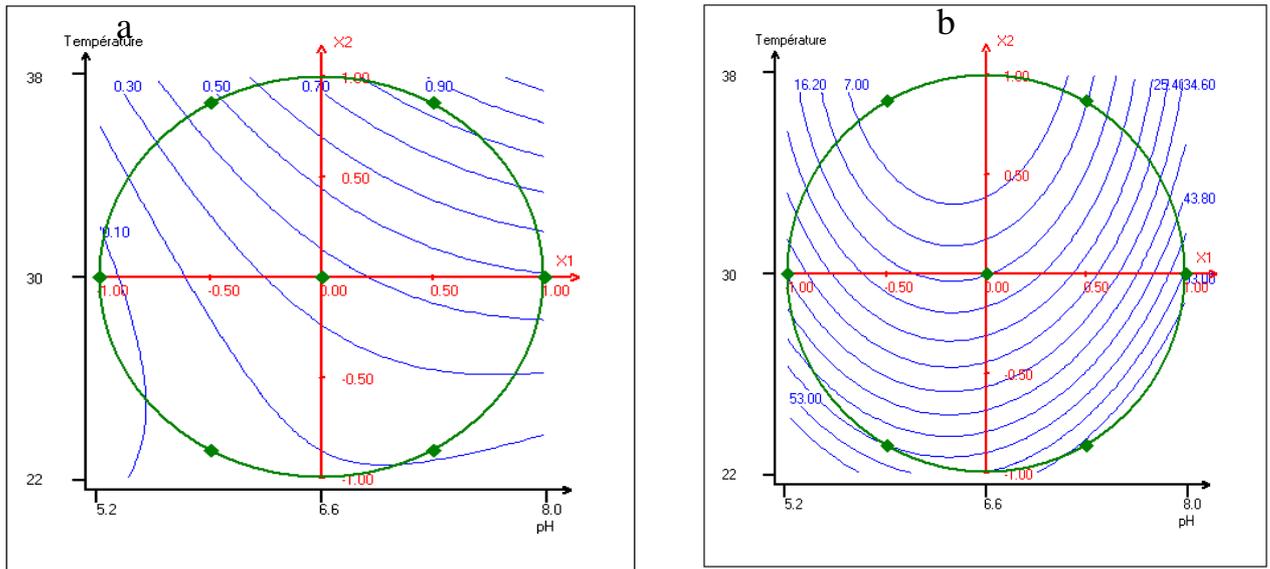
**Tableau 31:** Estimation des coefficients des modèles quadratiques pour deux variables, le pH (5,20 à 8,00) et la température (23 à 37 °C)

coefficients	$V_{max}$			$T_{max}$		
	C	S	L	C	S	L
b0	0,130*	0,360*	0,455**	19,000**	16,000	9,000***
b1	0,067	0,272*	0,197*	-7,667*	9,667	0,167
b2	0,006	0,274*	0,121	19,630**	-27,135*	-4,330**
b11	-0,020	-0,080	-0,070	7,500*	28,000	1,000
b22	-0,120	0,103	-0,037	28,166**	10,000	4,667**
b12	0,069	0,179	0,058	-6,928	-11,55	-0,577
$R^2$	0,905	0,975	0,965	0,998	0,967	0,998
$R^2A$	0,669	0,912	0,878	0,993	0,884	0,993

Les coefficients sont déterminés par le calcul des paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $T_{max}$ ; ( $b_0$ ) : la constante, ( $b_1$ ) : impact du pH; ( $b_2$ ) : de la température; ( $b_{11}$ ) du carré du pH; ( $b_{22}$ ) du carré de la température; ( $b_{12}$ ) : de l'interaction pH-température; ( $A^2$ ) : corrélation entre les valeurs théoriques et calculées.

La température est le facteur prépondérant sur la réponse qu'il convient d'augmenter. Les courbes d'isoréponses de  $V_{max}$ , en fonction de la température et du pH, indiquent que les

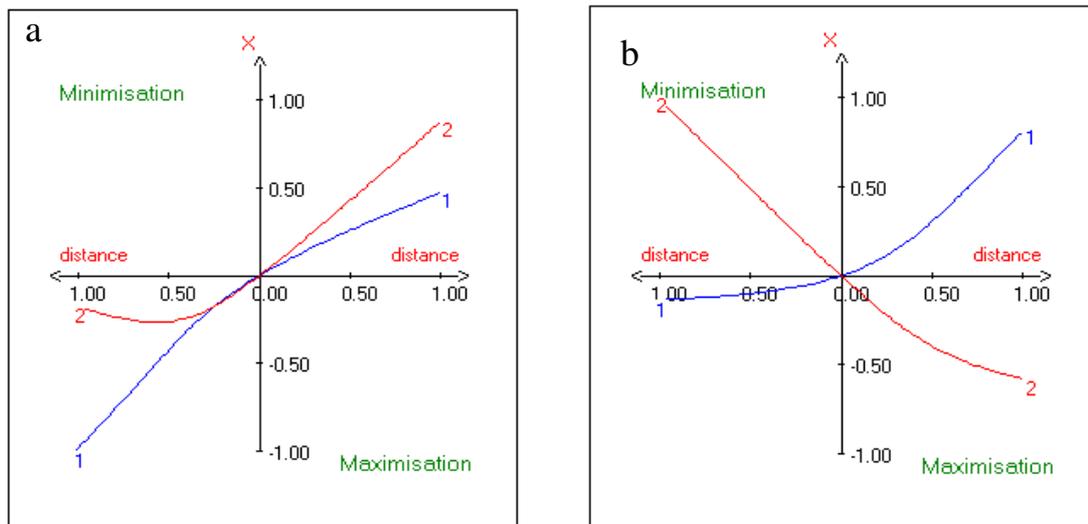
valeurs les plus élevées sont observées pour des valeurs de pH proches de la neutralité à température élevée (37 °C).



**Figure 22:** Courbes d'isoréponses de  $V_{max}$  et de  $T_{max}$  de *S. thermophilus* INRA 302 en fonction du pH et de la température du lait-YE  
(a) :  $V_{max}$  ; (b) :  $T_{max}$

La valeur de  $T_{max}$  traduit mieux que le paramètre  $V_{max}$  les performances acidifiantes de cette souche. La valeur la moins élevée (7 h) est obtenue entre 34 et 37 °C pour des valeurs de pH entre 5,90 et 7,30. Ces résultats confirment le caractère « thermophile » de *S. thermophilus* INRA 302 et son aptitude à pousser à des valeurs de pH faiblement acides.

Le facteur  $V_{max}$  doit être maximisé et le  $T_{max}$  minimisé afin d'obtenir les performances acidifiantes les plus grandes. Les conditions de culture permettant d'optimiser la valeur de  $V_{max}$  de *S. thermophilus* INRA 302 sont une température de 36 °C et un pH de 7,1. La combinaison 37 °C-pH 7,6 permet de minimiser  $T_{max}$  (Figure 23).



**Figure 23:** Etude des chemins optima de  $V_{\max}$  et de  $T_{\max}$  de *S. thermophilus* INRA 302 en fonction de la température et du pH

(a) :  $V_{\max}$  ; (b) :  $T_{\max}$

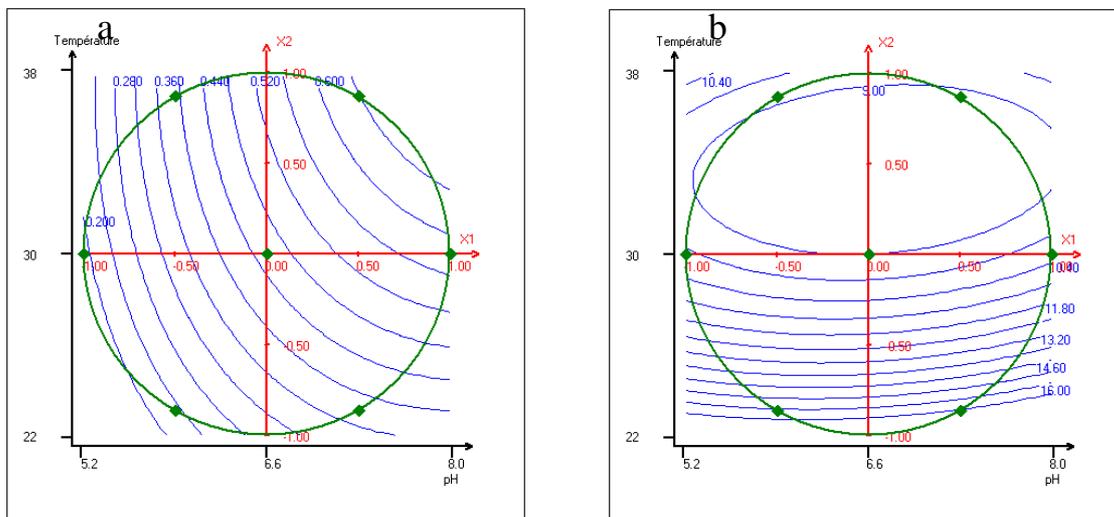
#### \* La souche *Lc. lactis* DSM 20481

*Lactococcus lactis* DSM 20481, souche mésophile, est influencé par les deux paramètres pH et température. Dans la gamme de température entre 23 et 37 °C et de pH entre 5,20 et 8,00, la valeur de  $V_{\max}$  varie de 0,22 (pH 5,20-30 °C) à 0,55 unité  $\text{pH}\cdot\text{h}^{-1}$  (pH 8,00 - 30 °C) (Tableau 30). Cette souche a une activité maximale à 30 °C pour des valeurs de pH faiblement alcalines. La valeur la plus faible de  $T_{\max}$  (9 h) est observée lorsque le pH est de 6,60 à 30 °C ou de 5,90 à 37 °C.

Les coefficients quadratiques qui permettent de sélectionner les facteurs les plus influents montrent que le pH et la température exercent un impact positif sur  $V_{\max}$  (Tableau 31). Les augmentations du pH (0,197) et de la température (0,121) améliorent les performances acidifiantes ( $V_{\max}$ ) de cette souche. La diminution du paramètre  $T_{\max}$  est obtenue par diminution de la valeur de pH (0,167), mais surtout par l'augmentation de la température (-4,330) par rapport aux valeurs correspondant au centre du domaine expérimental (30 °C et pH 6,60).

Les courbes d'isoreponses en fonction du pH et de la température (Figure 24) indiquent que la meilleure performance acidifiante est obtenue pour des températures supérieures à 35 °C à un pH de 7,30 ; le paramètre  $T_{\max}$  est exclusivement influencé par la température

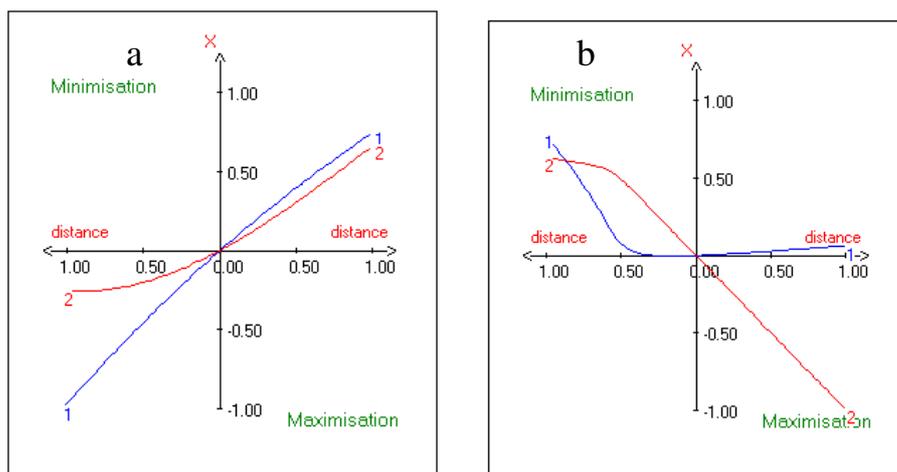
d'incubation et la valeur du pH n'a pas beaucoup d'impact sur le temps d'adaptation de cette souche lactique.



**Figure 24:** Courbes d'isoréponses de  $V_{\max}$  et de  $T_{\max}$  de *Lc. lactis* DSM 20481 en fonction de la température et du pH

(a) :  $V_{\max}$  ; (b) :  $T_{\max}$

Les conditions de culture permettant d'optimiser le paramètre  $V_{\max}$  de *Lc. lactis* DSM 20481 sont une incubation à 32 °C à un pH de 7,5. Afin d'obtenir les performances acidifiantes les plus grandes, il convient de minimiser  $T_{\max}$  ; ces conditions sont 32 °C à pH 7,3 (Figure 25).



**Figure 25:** Etude des chemins optima de  $V_{\max}$  et de  $T_{\max}$  de *Lc. lactis* DSM 20481 en fonction de la température et du pH

(a) :  $V_{\max}$  ; (b) :  $T_{\max}$

Cette souche serait donc la plus active pendant l'égouttage des fromages, lorsque le pH du caillé atteint la valeur de 5,20, car elle apparaît comme la plus acidotolérante des trois souches étudiées. En revanche, elle sera moins active pendant l'affinage (13 °C) et le stockage des fromages au froid en raison de son caractère mésophile.

**\* La souche *C. maltaromaticum* LMA 28**

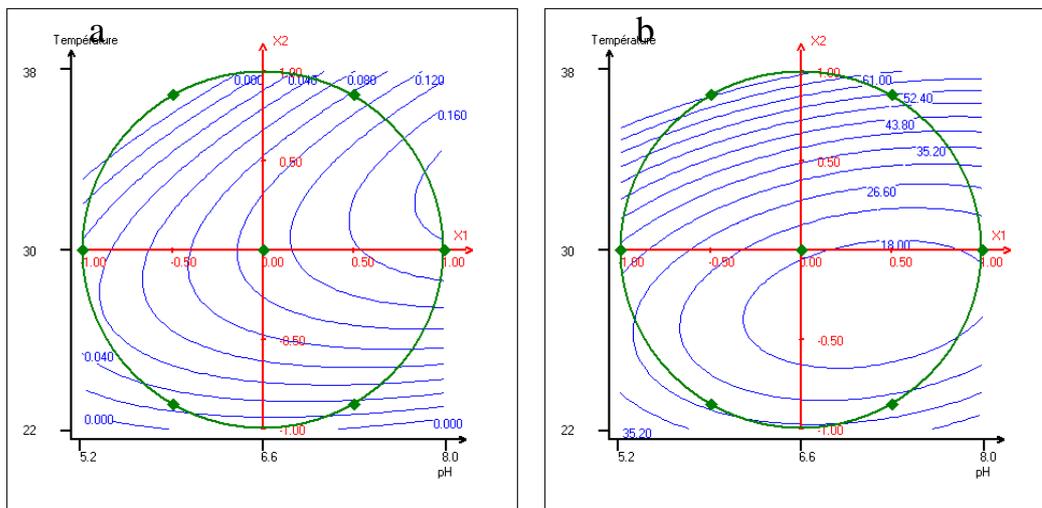
La valeur de  $V_{\max}$ , pour cette souche faiblement acidifiante, varie entre 0 (pH 5,90 - 37 °C) et 0,2 unité  $\text{pH}\cdot\text{h}^{-1}$  (pH 8,00 - 30 °C) (Tableau 30). La plus petite valeur de  $T_{\max}$  (18 h) est observée pour la combinaison pH 8,00 - 30 °C, en relation avec la capacité de cette souche à se développer à des pH alcalins. Cette valeur est 4 fois plus faible que celle observée dans des conditions défavorables (pH 5,90-37 °C).

Les équations qui prédisent la variation de  $V_{\max}$  et de  $T_{\max}$  dans le domaine expérimental, montrent que le pH et la température influencent faiblement  $V_{\max}$  et  $T_{\max}$  (Tableau 31). Les augmentations du pH (0,067) et de la température (0,006) permettent à cette souche lente d'acidifier plus rapidement le lait. Le pH a un impact négatif sur  $T_{\max}$ , car il faudrait augmenter le pH (-7,667) afin de diminuer la valeur de  $T_{\max}$ . En revanche, la température influence positivement  $T_{\max}$ , car toute augmentation de la température (19,630) augmente  $T_{\max}$ .

Les courbes d'isoréponses de  $V_{\max}$  en fonction du pH et de la température montrent que la valeur de  $V_{\max}$  est affectée par les paramètres températures et pH (Figure 26a). Quelle que soit la température d'incubation, les valeurs de pH inférieures à 6,60 la ralentissent, tandis que les valeurs supérieures l'augmentent. L'augmentation de la température, de 23 à 30 °C, augmente  $V_{\max}$ . La meilleure performance acidifiante est observée pour les pH basiques, supérieurs à 7,30, à 32 °C. Ces résultats traduisent la capacité de cette souche à se développer pendant l'affinage et le stockage des fromages au froid.

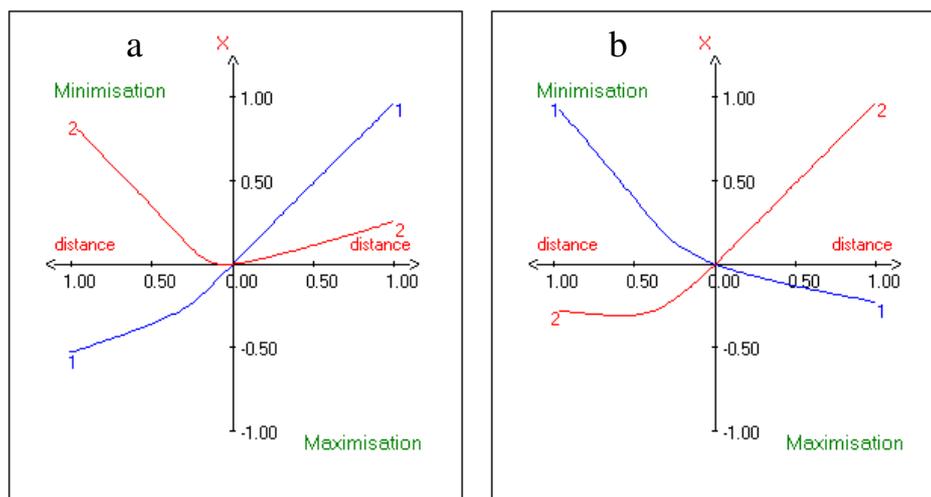
La plage d'optimisation du paramètre  $T_{\max}$  est comprise entre 25 et 28 °C et celles des valeurs de pH entre 6,0 et 8,0. Le  $T_{\max}$  est davantage affecté par les températures supérieures à 30 °C que par le pH (Figure 26b). Cette souche serait donc moins active pendant la coagulation du lait (39 à 32 °C) ; pour certaines spécialités fromagères, elle serait ralentie par le pH acide (5,20) obtenu en fin d'égouttage. Les températures

d'affinage (13 °C) ou de stockage (4 °C) et le pH d'affinage (7,30 à 8,00) sont favorables à *C. maltaromaticum* LMA 28.



**Figure 26:** Courbes d'isoréponses de  $V_{\max}$  et de  $T_{\max}$  de *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction de la température et du pH du lait-YE  
(a) :  $V_{\max}$  ; (b) :  $T_{\max}$

Les conditions de culture qui optimisent la valeur de  $V_{\max}$  de *C. maltaromaticum* LMA 28 sont l'incubation à 32 °C à pH 7,9. Le paramètre  $T_{\max}$  est minimisé à 28 °C à pH 8,0 (Figure 27).



**Figure 27:** Etude des chemins optima de  $V_{\max}$  et de  $T_{\max}$  de la température en fonction du pH  
(a) :  $V_{\max}$  ; (b) :  $T_{\max}$

En technologie fromagère de type pâte molle, ces trois souches lactiques interviendront à des étapes différentes du processus. *Streptococcus thermophilus*, souche « thermophile », acidifie très rapidement le lait. Cette espèce peut ainsi être inoculée dans des laits à 39 °C, contre 32-34 °C pour la majorité des laits pour la fabrication de fromages à pâte molle. *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus utilisée ; mésophile, elle prendra le relais de *S. thermophilus* lors de l'étape d'acidification lactique, lorsque la température du caillé diminuera pour se mettre en équilibre avec la température de la salle d'égouttage (28-30 °C).

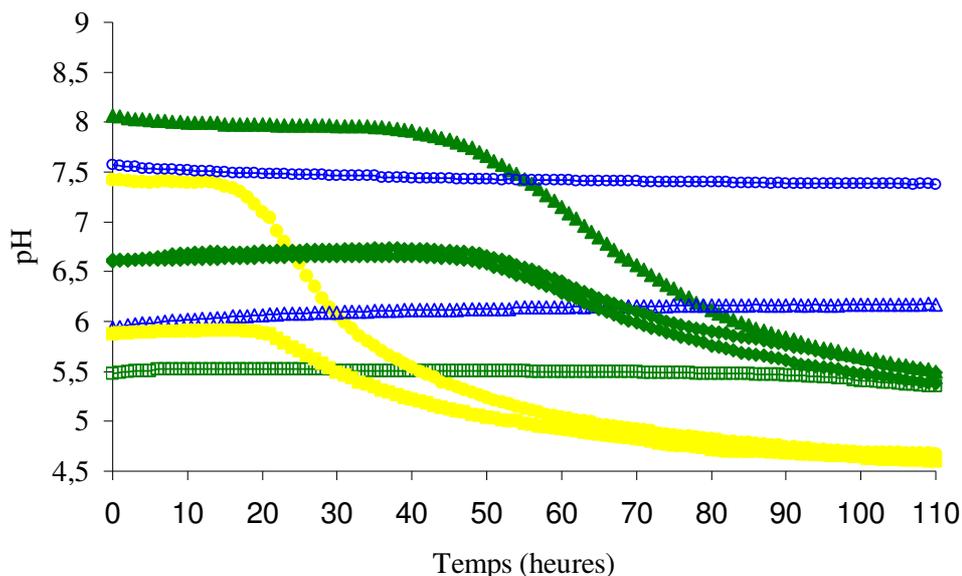
*Carnobacterium maltaromaticum* est psychrotrophe. Cette espèce est capable de pousser à des valeurs de pH alcalines (7,5-8,0), rencontrées dans des fromages très protéolysés. Elle est donc davantage indiquée comme flore d'affinage. Afin d'étudier son comportement pendant l'affinage et le stockage des fromages en réfrigération, il s'avère important d'analyser son comportement dans une gamme de « températures froides » (3-23 °C).

#### IV.3.5.2. « Températures froides »

La mesure de l'activité acidifiante de *C. maltaromaticum* LMA 28, entre 3 et 13 °C, dans des conditions qui miment la variation de températures lors de l'affinage et du stockage des fromages en réfrigération, pour des valeurs de pH comprises entre 5,20 et 8,00, a permis de confirmer son caractère psychrotrophe (Figure 28).

Aucune variation significative ( $\Delta\text{pH} \geq 0,5$  unité) de l'acidité n'est observée à 3 °C, (pH entre 5,90 et 7,30) et à 13 °C (pH 5,20). De ce fait, les paramètres cinétiques  $V_{\text{max}}$  et  $T_{\text{max}}$  n'ont pu être déterminés et les résultats n'ont pu être exploités par le logiciel Nemrod®.

Cette souche est capable de se développer à 13 °C lorsque le pH est basique (8,00) ou quasi neutre (6,60), avec une  $V_{\text{max}}$  de 0,04 unité  $\text{pH}\cdot\text{h}^{-1}$  et un  $T_{\text{max}}$  de 62 h. Les valeurs de  $V_{\text{max}}$ , obtenues à 23 °C, communes aux deux plans d'expériences, sont quasi identiques. En revanche, les valeurs de  $T_{\text{max}}$ , de 25 ou de 21 h, sont dues à des charges bactériennes initiales différentes de  $2,9\cdot 10^4$  ou de  $2,5\cdot 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>, car le  $T_{\text{max}}$  est affecté par la population bactérienne initiale (Corrieu *et al.*, 1988).



**Figure 28:** Acidification du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par *C. maltaromaticum* LMA 28 en fonction du pH à 3, 13 et à 23 °C. Inoculation de  $2,5 \cdot 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> à l'aide d'une préculture de 24 h en TSB-YE reconstitué avec du glucose.  
 (●) : pH 7,4 à 23 °C ; (■) : pH 5,9 à 23 °C ; (▲) : pH 8,1 à 13 °C ; (◆) : pH 6,6 à 13 °C ; (□) : pH 5,5 à 13 °C ; (○) : pH 7,6 à 3 °C ; (△) : pH 5,9 à 3 °C.

Outre son aptitude à pousser à 30 °C, cette souche peut également croître lors de l'affinage (14 °C) et lors du stockage des fromages en réfrigération (4-6 °C).

Les mesures de l'activité acidifiante de ces trois souches, dans les conditions de pH et de température simulant les différentes étapes d'une fabrication fromagère, fournissent des renseignements pour des associations bactériennes. Cependant, afin de sélectionner et d'associer ces souches d'intérêt, certaines caractéristiques métaboliques devront être étudiées, notamment l'acidotolérance et la production de substances antagonistes, comme les bactériocines.

#### IV.3.6. Comportement de *C. maltaromaticum* LMA 28 en co-culture avec *Lc. lactis* DSM 20481 dans du lait-YE

Ces deux souches lactiques ont été inoculées à différents niveaux de population, soit de façon séparée (culture pure), soit de façon simultanée (co-culture), soit de façon séquencée. Les dénombrements cellulaires des cultures pures ont été réalisés sur le milieu non sélectif TSA-YE ; pour les co-cultures, la numération de la flore totale a été effectuée sur TSA-YE

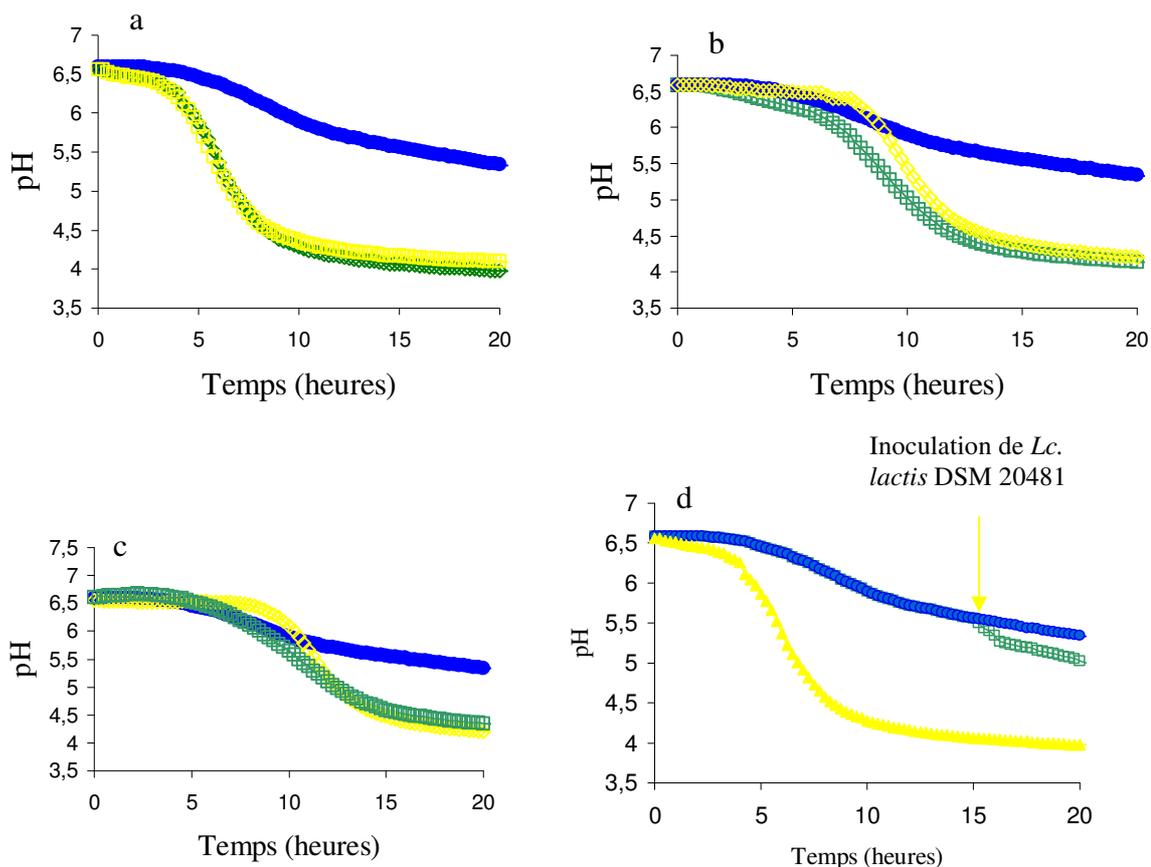
et celle de *C. maltaromaticum* LMA 28 sur le milieu sélectif CM. Ces essais confirment l'acidification lente et modérée du lait par *C. maltaromaticum* LMA 28, comparativement à celle obtenue avec *Lc. lactis* DSM 20481.

Lorsque les populations initiales sont équivalentes, respectivement  $8,2 \cdot 10^6$  et  $3,7 \cdot 10^6$  pour *C. maltaromaticum* LMA 28 et pour *Lc. lactis* DSM 20481, la cinétique d'acidification obtenue par cette association est quasi identique à celle observée avec uniquement *Lc. lactis* DSM 20481 (figure 29a) : la  $V_{\max}$  est de 0,5 unité  $\text{pH} \cdot \text{h}^{-1}$  et le  $T_{\max}$  est de 6 h.

Lorsque la population initiale en *Lc. lactis* DSM 20481 est globalement 100 fois plus faible ( $4 \cdot 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup>) que celle de *C. maltaromaticum* LMA 28 ( $7,0 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>) (figure 29c) ou plus d'un million de fois plus faible ( $2,9 \cdot 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup>) (Figure 29b), la diminution significative de la valeur initiale du pH de ces co-cultures intervient plus rapidement que celle de la culture pure de *Lc. lactis* DSM 20481. Cette observation tendrait à montrer une activité acidifiante totale plus importante lors de la combinaison de ces deux souches, malgré des niveaux de population très faibles en *Lc. lactis* DSM 20481. Ensuite l'acidification de la culture pure de *Lc. lactis* DSM 20481 est quasi identique à celles des co-cultures, avec des valeurs de pH similaires à 20 h d'incubation.

L'addition en proportion et en quantités importantes de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans un levain mixte accélérerait temporairement la capacité acidifiante globale de ce cocktail. L'inoculation tardive de *Lc. lactis* DSM 20481 (15 h) dans une culture de *C. maltaromaticum* LMA 28, même à un niveau de population 500 fois plus faible, provoque un abaissement significatif de la valeur de pH (Figure 29d), comparativement à celui de la culture pure de *C. maltaromaticum* LMA 28.

Dans les co-cultures, ces essais montrent globalement que *Lc. lactis* DSM 20481 contrôle la cinétique d'acidification, même lorsque *C. maltaromaticum* LMA 28 est présent en quantités très élevées à l'origine dans cette combinaison.



**Figure 29:** Cinétiques d'acidification de *C. maltaromaticum* LMA 28 en co-culture avec *Lc. lactis* DSM 20481 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec  $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure et incubé à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$

L'ensemencement a été fait à l'aide d'une préculture de 15 h sur TSB-YE, pour *C. maltaromaticum* LMA 28, sur lait pour *Lc. lactis* DSM 20481 (a) : inoculation de  $8,7 \cdot 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *Lc. lactis* DSM 20481 et de  $8,2 \cdot 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 ; (b) : inoculation de  $7,0 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 au début de l'incubation et de  $1,40 \cdot 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *Lc. lactis* DSM 20481 après 15 h d'incubation ; (c) : inoculation de  $2,9 \cdot 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *Lc. lactis* DSM 20481 et de  $6,9 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 ; (d) : inoculation de  $4,0 \cdot 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *Lc. lactis* DSM 20481 et de  $4,8 \cdot 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 ; (●) : *C. maltaromaticum* LMA 28; (◇) ; *Lc. lactis* DSM 20481; (□) : *C. maltaromaticum* LMA 28 + *Lc. lactis* DSM 20481.

*Lactococcus lactis* est l'espèce bactérienne mésophile la plus utilisée en fabrication fromagère. Cependant, certaines fabrications dites « thermophiles », utilisent *Streptococcus thermophilus* comme flore technologique ; il est de ce fait intéressant d'étudier le comportement de *C. maltaromaticum* souche psychrotrophe, en co-culture avec cette souche « thermophile » à  $30$ ,  $34,5$  et  $39 \text{ }^\circ\text{C}$ .

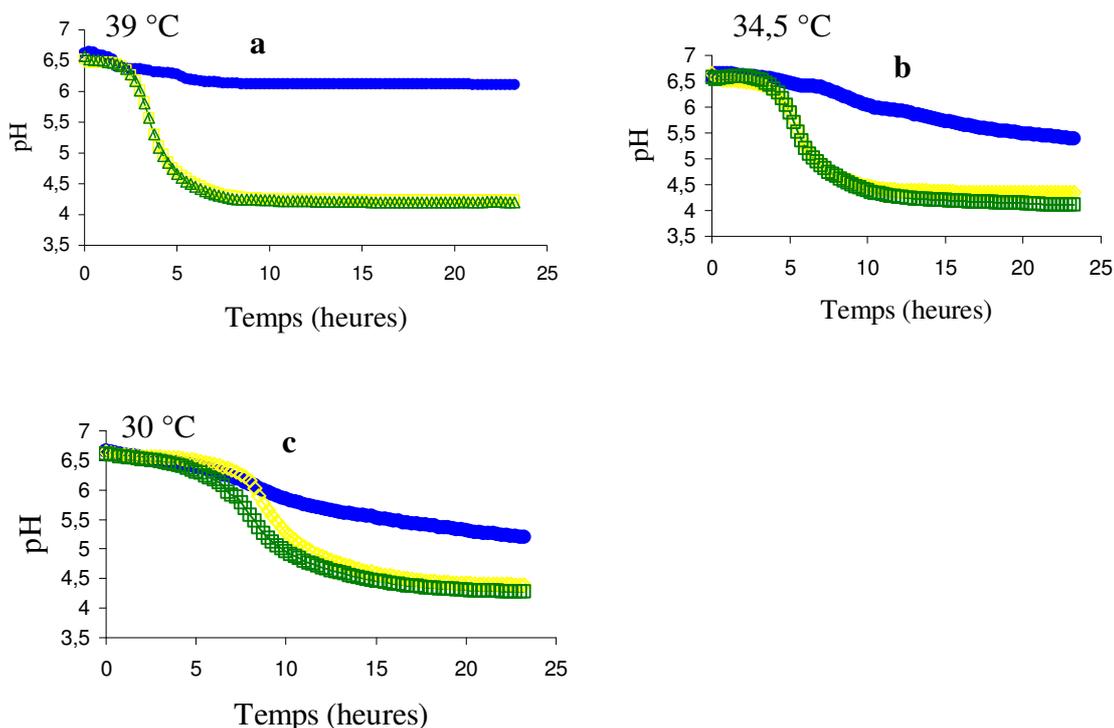
#### IV.3.7. Comportement de *C. maltaromaticum* LMA 28 en co-culture avec *S. thermophilus* INRA 302 dans du lait-YE

Ces essais ont été réalisés avec une population initiale en *C. maltaromaticum* LMA 28 ( $1,2 \cdot 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup>) environ 16 fois plus élevée que celle de *S. thermophilus* INRA 302 ( $7,6 \cdot 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup>).

A 39 °C, *C. maltaromaticum* LMA 28 acidifie très lentement et faiblement le lait, rendant impossible la détermination des paramètres  $V_{\max}$  et  $T_{\max}$  (Figure 30a) ; sa population après 20 h d'incubation est de  $2,3 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>. La culture pure de *S. thermophilus* INRA 302 présente les mêmes cinétiques d'acidification avec une  $V_{\max}$  de 0,90 unité pH.h<sup>-1</sup>, un  $T_{\max}$  de 3 h et une population finale de  $7,9 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>.

A 34, 5 °C, l'activité acidifiante de *C. maltaromaticum* LMA 28 est beaucoup plus importante puisque la valeur de pH 5,5 est atteinte en 21 h d'incubation (Figure 30b). Les paramètres cinétiques  $V_{\max}$  et  $T_{\max}$  ne peuvent cependant être déterminées. En co-culture et en culture pure de *S. thermophilus* INRA 302, les cinétiques d'acidification sont similaires avec un  $V_{\max}$  de 0,60 unité pH.h<sup>-1</sup> et un  $T_{\max}$  de 5 h. La souche de *S. thermophilus* n'est plus dans des conditions optimales pour sa croissance.

A 30 °C, *C. maltaromaticum* LMA 28 acidifie plus rapidement le lait car la valeur de pH de 5,5 est atteinte en 16 h, résultat en relation avec son caractère psychrotrophe (Figure 30c). En co-culture et en culture pure de *S. thermophilus* INRA 302, les deux cinétiques d'acidification diffèrent. L'association de ces deux bactéries lactiques permet une acidification plus précoce et plus importante du lait que celle observée avec la culture pure de *S. thermophilus* INRA 302 avec des valeurs de  $V_{\max}$  respectivement de 0,50 et de 0,40 unité pH.h<sup>-1</sup> et la même valeur de  $T_{\max}$  de 8 h.



**Figure 30:** Acidification du lait UHT demi-écrémé stérilisé supplémenté ou non avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure par *S. thermophilus* INRA 302 ou par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30, 34,5 et 39 °C

Inoculation de  $7,6 \cdot 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *S. thermophilus* INRA 302 et de  $1,2 \cdot 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 à l'aide d'une préculture de 15 h sur TSB-YE ; (●): *C. maltaromaticum* LMA 28; (○) *S. thermophilus* INRA 302; (□): *C. maltaromaticum* LMA 28 + *S. thermophilus* INRA 302.

Tous les essais en co-cultures, associant *C. maltaromaticum* LMA 28 et *Lc. lactis* DSM 20381 ou *S. thermophilus* INRA 302, indiquent que la croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28 n'est pas entravée par la production rapide d'acide lactique par ces deux souches rapides car sa population est environ de  $9,0 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> à 24 h d'incubation. Les cinétiques d'acidification des co-cultures sont d'autant plus gouvernées par *S. thermophilus* INRA 302 que la température d'incubation est plus favorable à cette espèce.

La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 est capable de pousser même lentement à pH 4,9, valeur correspondant au pH en fin d'égouttage de certaines spécialités fromagères. Elle possède également la particularité de croître à des valeurs élevées de pH (jusqu'à 9,6) ; sa croissance serait donc favorisée lors de la remontée du pH pendant l'affinage. Toutes les bactéries lactiques ne possèdent pas deux caractéristiques technologiques intéressantes, acidification et aromatisation. Bien que faiblement acidifiante, *C. maltaromaticum* LMA 28 pourrait produire des gels lactiques et des notes aromatiques exploitables au cours de la

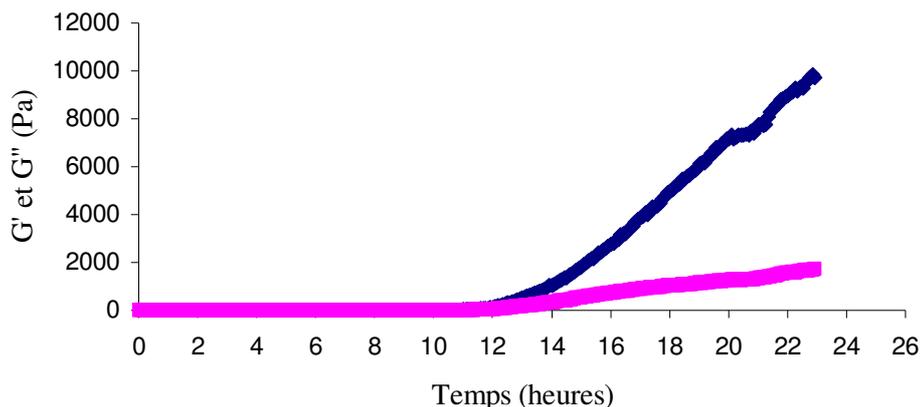
remontée du pH des fromages. Il s'avère donc nécessaire d'évaluer ses potentialités de production d'arôme malté et de caractériser la texture du gel lactique.

#### **IV.4. PARAMETRES RHEOLOGIQUES DES GELS PRODUITS PAR *C. MALTAROMATICUM* LMA 28 ET *S. THERMOPHILUS* INRA 302**

##### **IV.4.1. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28**

Les paramètres rhéologiques  $G'$ ,  $G''$  et  $\tan\delta$  permettent de caractériser la texture du lait fermenté. Le lait UHT demi-écrémé supplémenté avec  $1 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure a étéensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C, la figure 31 rapporte l'évolution du module visqueux de conservation  $G'$  et du module élastique de perte  $G''$  en fonction du temps.

Le profil de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps, du laitensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 est différent de la courbe typique de gélification car le paramètre  $G'$  est trop élevé (9000 Pa) et le plateau n'a pas été atteint (Figure 31). Les propriétés rhéologiques du caillé lactique ainsi obtenu n'ont pu être déterminées. Cette souche n'acidifie que très lentement le lait. La coagulation lactique intervient pour une valeur de pH de 5,0 à 30 °C. Ce gel n'est formé qu'après plus 20 h de culture même si la charge initiale de l'inoculum est très importante. Le dépôt du lait, sur l'appareil de mesure déjà partiellement acidifié (pH 5,8 à 30 °C) afin d'éviter un dessèchement trop important du gel, ne répond pas aux conditions optimales de ce protocole opératoire. Cette dessiccation, modifie les résultats car la durée de l'expérimentation sur 0,7 mL de lait en voie de coagulation, dure 35 h à 30 °C. Le témoin lait nonensemencé n'a pas été réalisé afin d'analyser les phénomènes d'adhésion et de dessiccation de l'expérimentation, car une contamination microbienne peut se produire et donner des résultats aberrants. Cet essai n'a permis que d'obtenir les paramètres rhéologiques pour le caillé réalisé avec *S. thermophilus* INRA 302, souche lactique conventionnelle, très rapide et « thermophile ».



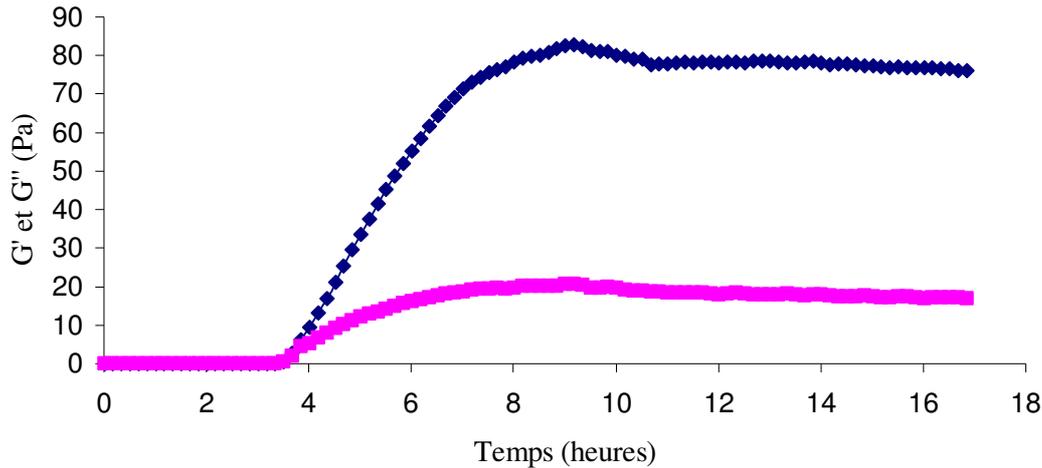
**Figure 31:** Paramètres rhéologiques du gel produit par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C. Le lait UHT stérilisé demi-écrémé a été supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. (■) : module visqueux de conservation G'; (■) : Module élastique de perte G''

#### IV.4.2. La souche *S. thermophilus* INRA 302

Le lait UHT demi-écrémé supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure a étéensemencé avec *S. thermophilus* INRA 302 et incubé à 37 °C. Les profils du module visqueux de conservation G' et du module de perte élastique G'' en fonction du temps sont rapportés dans la figure 38.

Le laitensemencé avec *S. thermophilus* INRA 302 présente un profil similaire à la courbe typique de gélification (Figure 32). La valeur de G'<sub>max</sub> est de 80,8 Pa et le temps de coagulation est de 4 h à 37 °C.

Le paramètre tanδ est un bon indicateur du caractère viscoélastique du gel ; plus il est faible, plus le gel est ferme (Lucey et Singh 1997). Le laitensemencé avec *S. thermophilus* INRA 302 présente une tanδ<sub>min</sub> faible (20,09) et une pente de 0,03. Ces résultats confirment le caractère rapide et fortement acidifiant de *S. thermophilus* INRA 302 comparée à celui de *C. maltaromaticum* LMA 28.



**Figure 32:** Paramètres rhéologiques du gel produit par *S. thermophilus* INRA 302 à 37 °C. Le lait UHT stérilisé demi-écrémé a été supplémenté avec 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. (■) : module visqueux de conservation G'; (■) : Module élastique de perte G''

La détermination de ces paramètres rhéologiques est impossible à réaliser dans nos conditions opératoires, car *C. maltaromaticum* LMA 28 est une souche très lente. Une augmentation importante de la biomasse initiale et l'apport de substrats facilement assimilables dans le lait, permettraient une cinétique d'acidification plus rapide, mais ces conditions ne peuvent être reproduites dans le contexte industriel.

➤ Les quatre souches *C. maltaromaticum*, « Réo », « Pérail », LMA 28 et DSM 20730<sup>T</sup>, dont les 3 premières sont issues de fromages, montrent des performances acidifiantes différentes. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 possède l'activité  $\beta$ -galactosidasique la plus importante ; elle est donc la plus adaptée au substrat lait. Le lait étant un substrat nutritionnellement non adapté à sa croissance, cette souche lente et exigeante nécessite de métaboliser des substrats facilement assimilables, comme l'extrait de levure, pour lui permettre une croissance plus rapide. La concentration optimisée en extrait de levure, ajouté dans le lait nécessaire pour améliorer significativement ses performances acidifiantes, est de 1 g.L<sup>-1</sup>. Comparativement à *Lc. lactis* DSM 20481 et à *S. thermophilus* INRA 302, *C. maltaromaticum* LMA 28 est une souche lente, même en présence d'extrait de levure. Les essais en co-cultures, l'associant avec *Lc. lactis* DSM 20381 ou avec *S. thermophilus* INRA 302, indiquent que l'acidification est contrôlée par la souche la plus acidifiante, mais sans modification importante du niveau de population en *C. maltaromaticum* LMA 28 à 24 h d'incubation à 30 °C. Dans certaines technologies fromagères de type pâte molle, ces trois souches lactiques interviendront à des étapes différentes du processus. *Streptococcus thermophilus* peut être inoculée dans des laits à 39 °C, *Lc. lactis* prendra le relais ensuite lors de

*l'étape d'acidification lactique, lorsque la température du caillé diminuera pour se mettre en équilibre avec la température de la salle d'égouttage (28-30 °C). Outre son aptitude à pousser à 30 °C, C. maltaromaticum peut également croître lors de l'affinage (12-14 °C) et lors du stockage des fromages en réfrigération (4-6 °C). Egalement capable de pousser à des valeurs de pH alcalines (7,5-8,0), rencontrées dans des fromages très protéolysés, cette espèce serait donc davantage indiquée comme flore lactique d'affinage jouant également un rôle positif pendant le stockage au froid. Le gel du lait acidifié par C. maltaromaticum LMA 28 présente une texture très friable.*



## **Chapitre V : Composés aromatiques et amines biogènes**



## V.1. DOSAGE DE COMPOSES AROMATIQUES

### V.1.1. Dosage du 3-méthylbutanal, du 2-méthylbutanal et du 2-méthylpropanal produits par *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE

Les aldéhydes, 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal et 2-méthylpropanal, proviennent respectivement de la dégradation de la leucine, de l'isoleucine et de la valine par les transaminases bactériennes (Ardo, 2006). Ces aldéhydes sont responsables des saveurs maltées, fruitées ou chocolatées de certains aliments, notamment le fromage et les laits fermentés (Preininger et Grosch, 1994 ; Curioni et Bosset, 2002). Les cultures de *C. maltaromaticum* LMA 28 ont été réalisées en TSB-YE supplémenté ou non avec 2 mM de leucine, d'isoleucine ou de valine, à 30 °C, afin de doser les aldéhydes produits.

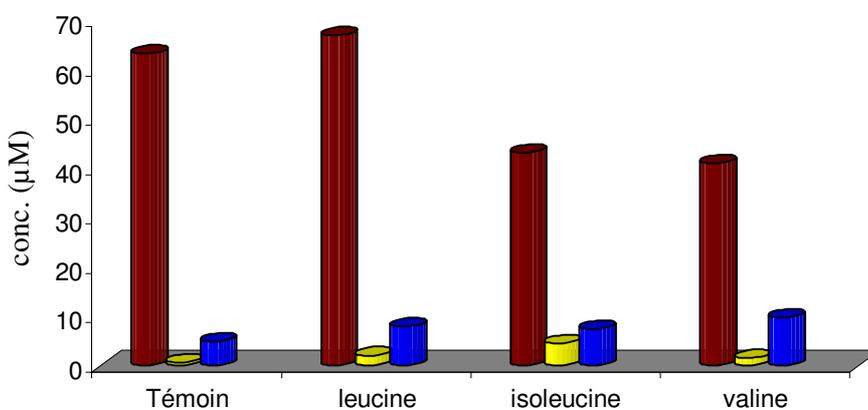
Les résultats obtenus montrent que cette souche est capable de dégrader ces trois acides aminés en produisant les aldéhydes correspondants (Figure 33). Le dosage de ces composés aromatiques, dans le TSB-YE non supplémenté avec les acides aminés (essai témoin) après 16 h de culture à 30 °C, montre que *C. maltaromaticum* LMA 28 produit 63,2 µM de 3-méthylbutanal, des traces de 2-méthylbutanal et 5 µM de 2-méthylpropanal.

L'ajout de 2 mM de leucine augmente les concentrations en ces trois aldéhydes, avec des valeurs respectivement de 67, 2,0 et 8,0 µM. L'addition de leucine n'améliore pas de façon importante la concentration en 3-méthylbutanal mais augmente les concentrations en 2-méthylbutanal et 2-méthylpropanal.

L'ajout de 2 mM d'isoleucine provoque des changements plus importants dans la production de ces trois aldéhydes. La concentration en 3-méthylbutanal chute à 43 µM, celle en 2-méthylbutanal est quasi doublée (4,5 µM), par rapport à l'essai avec ajout de leucine, et la concentration en 2-méthylpropanal reste équivalente à cet essai (7,5 µM). Par rapport au témoin, l'ajout de d'isoleucine diminue de plus de 30 % la concentration en 3-méthylbutanal, augmente de façon très importante celle en 2-méthylbutanal (traces dans l'essai témoin) et de 50 % celle en 2-méthylpropanal. Cet acide aminé est bien le précurseur du 2-méthylbutanal.

L'ajout de 2 mM de valine donne des résultats sensiblement comparables à ceux obtenus avec l'ajout d'isoleucine. Par rapport à l'essai témoin, la concentration en 3-méthylbutanal a chuté de 35 %, celle en 2-méthylbutanal (1,7 µM) a augmenté, ainsi que celle en 2-méthylpropanal (9,7 µM) d'environ 100 %.

Globalement, c'est donc l'addition de la leucine qui améliore le plus la production de ces trois composés aromatiques, car l'ajout de l'isoleucine et de la valine diminue de façon importante celle du 3-méthylbutanal.



**Figure 33:** Production de composés aromatiques par *C. maltaromaticum* LMA 28 en TSB-YE supplémenté avec 2 mM d'acides aminés après 16 h d'incubation à 30 °C  
Inoculation de  $2,6 \cdot 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 16 h en TSB-YE ; (■) : 3-méthylbutanal ; (■) : 2-méthylbutanal ; (■) : 2-méthylpropanal

La dégradation de la leucine par *C. maltaromaticum* a été rapportée par Larrouture *et al.* (2000) ; ces auteurs ont montré que *C. piscicola (maltaromaticum)* 545 produisait environ 25 ppm de 3-méthylbutanal dans un tampon phosphate additionné de 2 mM de leucine. La recherche de l'activité des transaminases des acides aminés branchés n'a pas été réalisée dans notre étude. Cependant, la production de ces trois aldéhydes suggère une activité importante des transaminases de *C. maltaromaticum* LMA 28. En effet, Urbach (1993), Yvon et Rijnen (2001) et Rijnen *et al.* (2003) avaient montré que les bactéries lactiques possèdent des transaminases. Ces enzymes transfèrent la fonction amine des acides aminés concernés sur son coenzyme, le pyridoxal-5-phosphate, avec libération d' $\alpha$ -céto-acides dont la décarboxylation forme l'aldéhyde correspondant. La production majoritaire de 3-méthylbutanal, dans nos conditions expérimentales, traduirait donc une forte activité de la

leucine transaminase comparativement à celle de la valine transaminase ; l'isoleucine transaminase serait la moins active dans nos conditions opératoires.

Le TSB est un milieu de culture complexe qui contient des peptones, dont les peptones papainiques. De même, l'extrait de levure est un milieu riche en acides aminés dont la composition exacte n'est pas fournie. Dans l'essai témoin, la présence de 3-méthylbutanal en quantité importante ne justifie pas un ajout de leucine au TSB-YE.

La production du 3-méthylbutanal par une souche de *C. maltaromaticum* a été rapportée par Larrouture-Thiveyrat et Montel (2003) dans le milieu CDM décrit par Hussain *et al.* (1991), additionné de 2 mM de leucine, et dans le saucisson. Joffraud *et al.* (2001) avaient attribué l'odeur de beurre et de caramel à *C. piscicola* dans la viande suite à la dégradation de la leucine. En 1974, Miller *et al.*, avaient isolé *Lactobacillus maltaromicus* dans du lait présentant une odeur de malt, espèce qui est maintenant dénommée *C. maltaromaticum*. Cependant, la production de composés maltés dans des produits laitiers par *C. maltaromaticum* n'a pas encore été réalisée.

Ces résultats montrent que *C. maltaromaticum* LMA 28 métabolise la leucine, l'isoleucine et la valine afin de produire les aldéhydes correspondants, en bouillon de laboratoire. Il s'avère donc maintenant nécessaire d'étudier sa capacité à métaboliser ces acides aminés dans une matrice alimentaire comme le lait.

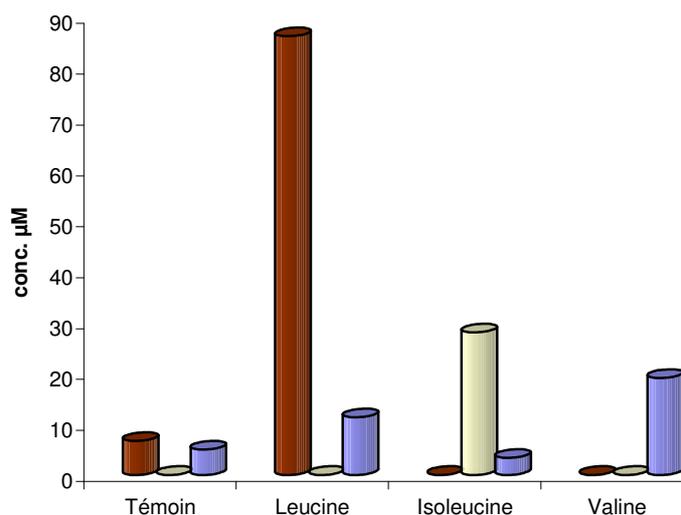
#### **V.1.2. Dosage du 3-méthylbutanal, du 2-méthylbutanal et du 2-méthylpropanal, produits par *C. maltaromaticum* LMA 28 dans le lait**

Le dosage de ces composés aromatiques a été réalisé dans du lait supplémenté ou non avec la leucine, l'isoleucine ou la valine (2 mM) etensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28.

Dans le lait non supplémenté (Figure 34), après 16 h d'incubation à 30 °C, *C. maltaromaticum* LMA 28 produit du 3-méthylbutanal (6,6 µM) et du 2-méthylpropanal (5 µM). L'ajout de 2 mM de leucine augmente de 13 fois la concentration en 3-méthylbutanal (86,2 µM) et d'environ 2 fois celle en 2-méthylpropanal (11,3 µM). L'addition d'isoleucine donne une concentration de 28 µM en 2-méthylbutanal, de 3,5 µM en 2-

méthylpropanal et seulement des traces de 3-méthylbutanal. Lorsque le lait est supplémenté avec de la valine, seule la présence du 2-méthylpropanal (19  $\mu\text{M}$ ) est observée, à une concentration quatre fois supérieure à celle du lait témoin. L'ajout d'isoleucine ou de valine au lait diminue de façon très importante la concentration en 3-méthylbutanal, même à un niveau très inférieur à celui produit dans le lait.

Comparativement au milieu TSB-YE, *C. maltaromaticum* LMA 28 produit ces aldéhydes dans du lait, notamment lorsque ce substrat est supplémenté avec ces trois acides aminés branchés. Comme précédemment observé, la production de 3-méthylbutanal dans le lait est plus importante que celle des autres aldéhydes, suggérant une activité élevée de la leucine transaminase. Seule l'optimisation de la production de cet aldéhyde sera réalisée dans notre étude.



**Figure 34:** Production de composés aromatiques dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec 2 mM d'acides aminés par *C. maltaromaticum* LMA 28 pendant 16 h à 30 °C

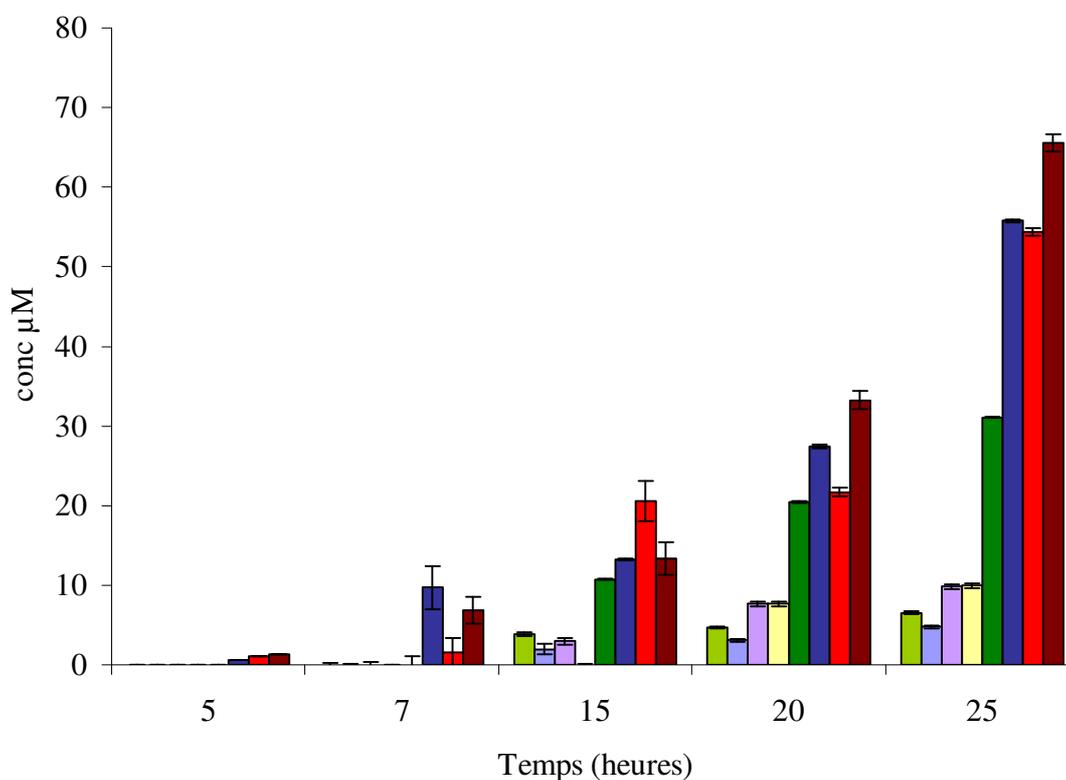
Inoculation de  $3,6 \cdot 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 16 h en TSB-YE ; (■) : 3-méthylbutanal ; (■) : 2-méthylbutanal ; (■) : 2-méthylpropanal

Dans le milieu CDMensemencé avec *C. maltaromaticum* (*piscicola*) 545, Larrouture-Thiveyrat et Montel (2003) avaient montré que la production du 3-méthylbutanal était optimisée en présence de leucine, de pyridoxal-5-phosphate et d'acide- $\alpha$ -céto-glutarique. Il

est intéressant de rechercher si ces conditions peuvent également être reproduites dans le lait.

### V.1.3. Effet de l'ajout des précurseurs d'arômes dans du lait sur la production du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28

Le lait UHT stérilisé demi-écrémé a été supplémenté ou non avec 2 mM de leucine, 2 mM de pyridoxal-5-phosphate et 10 mM d'acide- $\alpha$ -céto-glutarique, afin de suivre la production du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C. La concentration de cet aldéhyde dans le lait augmente au cours du temps (Figure 35).



**Figure 35:** Production du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec les précurseurs du 3-méthylbutanal à 30 °C Inoculation de  $2,1 \cdot 10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup> d'une préculture de 16 h sur TSB-YE ; (■) : lait ; (■) : lait + pyridoxal-5-phosphate ; (■) : lait + acide- $\alpha$ -céto-glutarique ; (■) : lait + pyridoxal-5-phosphate + acide- $\alpha$ -céto-glutarique ; (■) : lait + leucine ; (■) : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate ; (■) : lait + leucine + acide- $\alpha$ -céto-glutarique ; (■) : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate + acide- $\alpha$ -céto-glutarique ; ces résultats sont la moyenne de trois essais indépendants

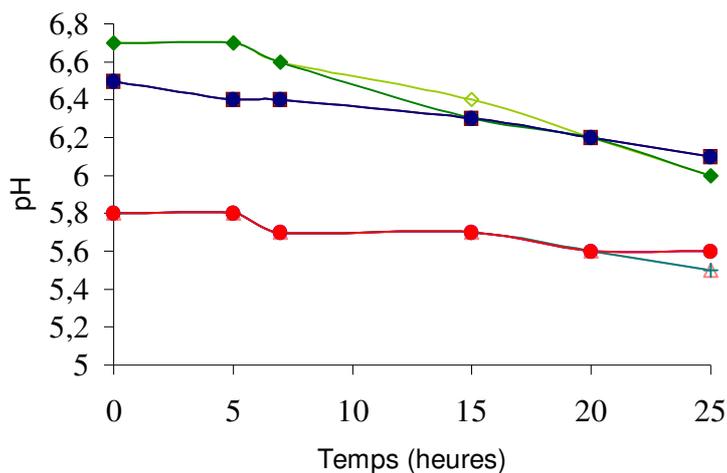
Dans les essais non supplémentés avec la leucine, mais additionnés d'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et de pyridoxal-5-phosphate, la concentration en 3-méthylbutanal est de 10  $\mu$ M.

L'addition uniquement du pyridoxal-5-phosphate diminue la production de 3-méthylbutanal puisqu'elle est seulement de 4,8  $\mu\text{M}$ , tandis que dans le lait non supplémenté (témoin) elle atteint 6,8  $\mu\text{M}$  après 25 h d'incubation à 30 °C. L'ajout uniquement de leucine ou de leucine associée avec l'acide- $\alpha$ -céto-glutarique, est favorable à la production de cet aldéhyde ; elle donne ainsi une concentration de 55,9  $\mu\text{M}$  contrairement à la combinaison leucine-pyridoxal-5-phosphate qui aboutit à seulement 31  $\mu\text{M}$ . La production du 3-méthylbutanal est maximale (65,6  $\mu\text{M}$ ) lorsque la leucine est combinée avec les deux co-facteurs dans le lait. Le lait est donc déficient à la fois en leucine et en ces deux co-facteurs.

Ces résultats pourraient traduire le fait que la leucine transaminase de *C. maltaromaticum* LMA 28 a besoin, par rapport à la composition du lait, d'un apport supplémentaire en leucine et en co-facteurs afin d'optimiser la production du 3-méthylbutanal. En effet, le pyridoxal-5-phosphate est un coenzyme de la leucine transaminase qui catalyse le transfert de la fonction amine de la leucine sur l'acide- $\alpha$ -céto-glutarique, entraînant la libération de l'acide  $\alpha$ -céto-isocaproïque et du glutamate ; la décarboxylation de cet  $\alpha$ -céto-acide donne le 3-méthylbutanal (Smit *et al.*, 2004).

La quantité de 3-méthylbutanal, produite dans le lait supplémenté avec 2 mM de leucine (Figure 35), est inférieure à celle observée dans les essais précédents (Figure 34). Cette disparité dans les résultats pourrait être attribuée à la volatilité de cet aldéhyde qui se serait volatilisé pendant la fermentation et les prélèvements, diminuant ainsi sa concentration au moment du dosage. Ces observations peuvent aussi être provoquées par une mauvaise séparation des composés par la colonne de la CPG en raison de modifications fréquentes des paramètres opératoires. D'une manière générale, les concentrations en cet aldéhyde n'ont jamais donné des résultats reproductibles.

L'addition d'acide- $\alpha$ -céto-glutarique au lait abaisse son pH de 0,9 unité (Figure 36). Cette condition n'est pas favorable car *C. maltaromaticum* LMA 28 se développe mieux lorsque le pH du milieu de culture est basique. La valeur du pH initial du lait peut donc exercer un impact important sur la production du 3-méthylbutanal. Le dosage de cet aldéhyde, après une neutralisation du pH initial du lait supplémenté en acide  $\alpha$ -céto-glutarique, permettrait de déterminer l'impact de cette acidité sur sa production.



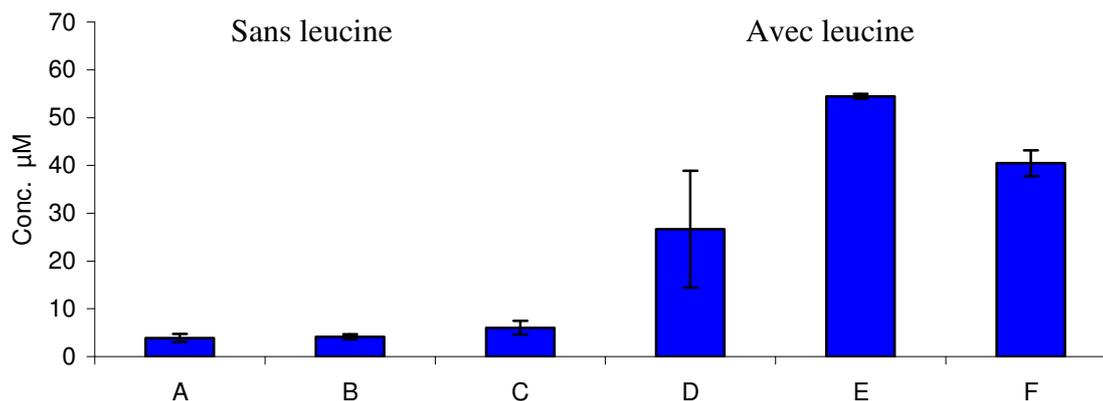
**Figure 36:** Variations du pH au cours de la croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec les précurseurs du 3-méthylbutanal à 30 °C

(◇) : lait ; (□) : lait + pyridoxal-5-phosphate ; (△) : lait + acide-α-cétoglutarique ; (○) : lait + pyridoxal-5-phosphate + acide-α-cétoglutarique ; (◆) : lait + leucine ; (■) : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate ; (▲) : lait + leucine + acide-α-cétoglutarique ; (●) : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate + acide-α-cétoglutarique

#### V.1.4. Dosage du 3-méthylbutanal dans du lait supplémenté avec les co-facteurs à pH acide et à pH basique

Les laits supplémentés avec la leucine, le pyridoxal-5-phosphate et l'acide α-cétoglutarique ont été additionnés de NaOH 1 N afin de les neutraliser. La figure 37 rapporte la production du 3-méthylbutanal dans ces conditions expérimentales.

Dans le lait additionné de co-facteurs sans neutralisation (pH 5,8), *C. maltaromaticum* LMA 28 produit 54,5 μM contre 40,5 μM lorsqu'il y a neutralisation. La neutralisation provoque une diminution de 25 % de la concentration en 3-méthylbutanal. Comme vu précédemment, la production du 3-méthylbutanal est optimisée avec l'association leucine+pyridoxal-5-phosphate+acide α-céto-glutarique.

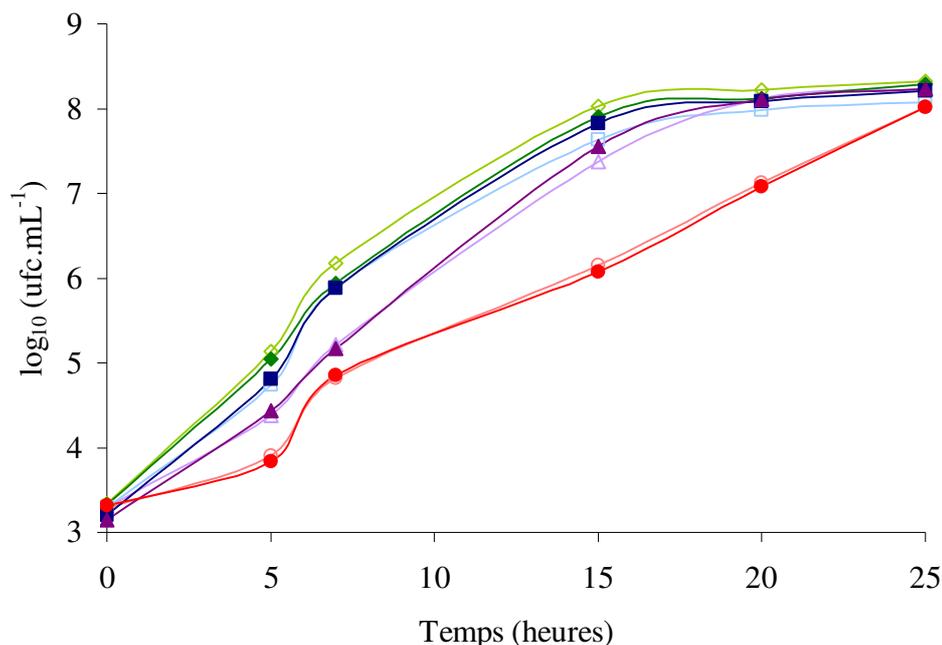


**Figure 37:** Production de composés aromatiques dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé additionné de précurseurs du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C pendant 25 h

**A :** lait non supplémenté ; **B :** lait supplémenté avec l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate sans neutralisation ; **C :** lait supplémenté avec l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate avec neutralisation ; **D :** lait supplémenté avec la leucine ; **E :** lait supplémenté avec la leucine, l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate sans neutralisation ; **F :** lait supplémenté avec la leucine, l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate avec neutralisation. Moyenne de trois essais indépendants.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de De Angelis et Gobbetti (2004), Guerzoni *et al.* (2007) qui ont rapporté que les bactéries lactiques mettent en place des mécanismes spécifiques qui leur permettent de se protéger lorsque l'environnement extérieur devient hostile à leur développement. Elles mettent en oeuvre, en particulier, leurs activités aminopeptidasiques qui sont à l'origine de la production des amines et des aldéhydes. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 semble donc privilégier sa survie, en produisant des composés organiques qui peuvent remonter le pH du milieu, lorsque celui-ci devient défavorable à sa croissance. Dans ces conditions, le développement de la souche est ralenti par le pH acide (5,9) (Figure 38), mais la production du 3-méthylbutanal est maximale.

Dans le lait et les produits laitiers, la production du 3-méthylbutanal, du 2-méthylbutanal et du 2-méthylpropanal par *C. maltaromaticum* n'a pas encore été étudiée, contrairement à *Lc. lactis* dans les fromages. Les espèces *C. maltaromaticum*, *Lc. lactis* et *S. thermophilus* ayant un intérêt important en technologie fromagère, il s'avère donc judicieux de doser la production du 3-méthylbutanal par chacune de ces souches en cultures pures afin d'estimer leurs contributions dans le profil aromatique des fromages.



**Figure 38:** Croissance de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé supplémenté avec les précurseurs du 3-méthylbutanal

(◇) : lait ; (□) : lait + pyridoxal-5-phosphate ; (△) : lait + acide- $\alpha$ -cétoglutarique ; (○) : lait + pyridoxal-5-phosphate + acide- $\alpha$ -cétoglutarique ; (◆) : lait + leucine ; (■) : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate ; (▲) : lait + leucine + acide- $\alpha$ -cétoglutarique ; (●) : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate + acide- $\alpha$ -cétoglutarique. Moyenne de trois essais indépendants

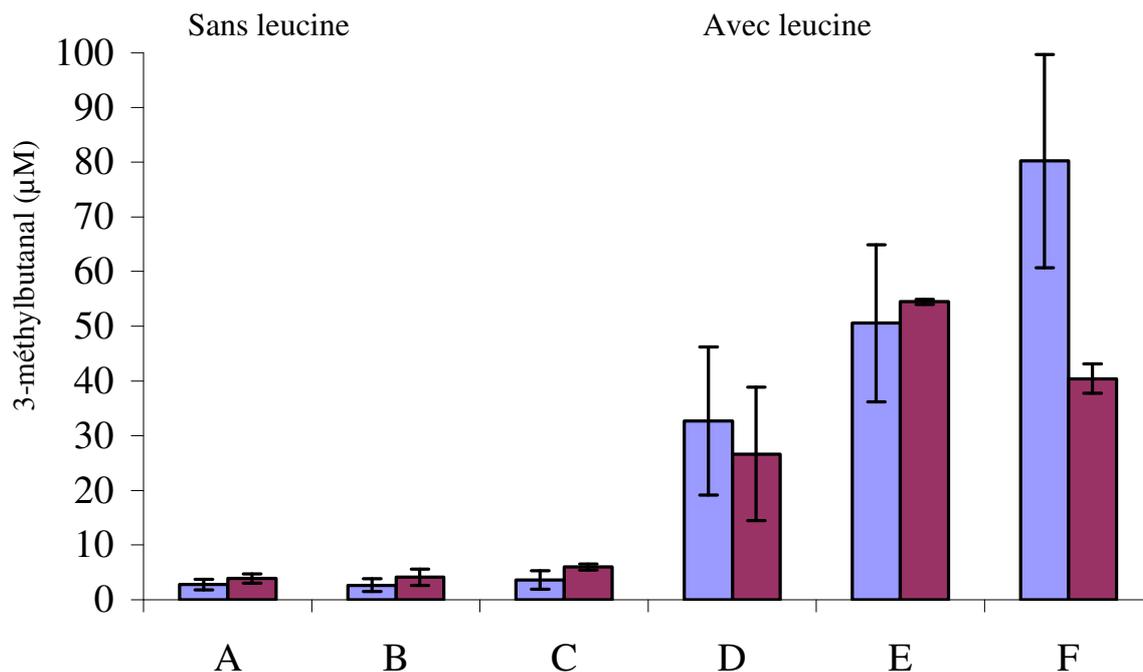
### V.1.5. Production du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302

Le lait a été supplémenté ou non avec la leucine, le pyridoxal-5-phosphate et l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique, puis neutralisé avec NaOH 1 N, afin de suivre la production du 3-méthylbutanal, par ces trois bactéries lactiques en culture pure.

La production de 3-méthylbutanal, par *S. thermophilus* INRA 302 à 37 °C pendant 25 h, n'a jamais été mise en évidence (Figure 39), résultat similaire à celui de Helinck *et al.* (2004). Dans leurs travaux, *S. thermophilus* CNRZ 302 métabolise la leucine grâce à la glutamate déshydrogénase afin de produire l'acide- $\alpha$ -cétolacique. Cette souche possède une faible activité  $\alpha$ -cétolacique décarboxylasique qui ne lui permet pas de produire le 3-méthylbutanal ; en revanche son activité  $\alpha$ -cétolacique déshydrogénasique

élevée lui permet de convertir les  $\alpha$ -céto-acides en acides carboxyliques correspondants qui ne sont pas des composés aromatiques.

Les souches *C. maltaromaticum* LMA 28 et *Lc. lactis* DSM 20481 produisent respectivement 54,5 et 50,5  $\mu\text{M}$  de 3-méthylbutanal lorsque le lait est supplémenté avec les trois précurseurs d'arômes sans neutralisation, et 40,5 et 80,2  $\mu\text{M}$  lorsque ces trois cofacteurs sont associés, après neutralisation par ajout de NaOH 1 N.



**Figure 39:** Production de 3-méthylbutanal dans du lait UHT stérilisé demi-écrémé par *Lc. lactis* DSM 20481 et par *C. maltaromaticum* LMA 28 à 30 °C pendant 25 h

A : lait ; B : lait supplémenté avec l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate sans neutralisation ; C : lait supplémenté avec l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate avec neutralisation ; D : lait supplémenté avec la leucine ; E : lait supplémenté avec la leucine, l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate sans neutralisation ; F : lait supplémenté avec la leucine, l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique et le pyridoxal-5-phosphate avec neutralisation ; (■) : *Lc. lactis* DSM 20481 ; (■) : *C. maltaromaticum* LMA 28. Moyenne de trois essais indépendants

Comme précédemment indiqué, la neutralisation du milieu n'est pas favorable à la production du 3-méthylbutanal par *C. maltaromaticum* LMA 28 ; en revanche, elle entraîne une augmentation de la production de cet aldéhyde par *Lc. lactis* DSM 20481. Ces deux souches présentent donc des comportements différents. La caractérisation de leurs équipements enzymatiques n'a pas été envisagée.

La production du 3-méthylbutanal par *Lc. lactis* dans les laits fermentés et les fromages a été rapportée dans plusieurs travaux (Narvhus *et al.*, 1998 ; Ayad *et al.*, 1999 ; Ayad *et al.*, 2003). Ces auteurs ont montré que *Lc. lactis* pouvaient produire jusqu'à 4,7 mg.kg<sup>-1</sup> (54µM) de 3-méthylbutanal dans les laits fermentés et que la présence de cet aldéhyde était responsable de la flaveur chocolatée ou fruitée du gouda.

Les souches *C. maltaromaticum* LMA 28 et *Lc. lactis* DSM 20481 sont donc capables de dégrader la leucine afin de produire l'aldéhyde correspondant, contrairement à *S. thermophilus* INRA 302, qui dégrade la leucine sans production de 3-méthylbutanal.

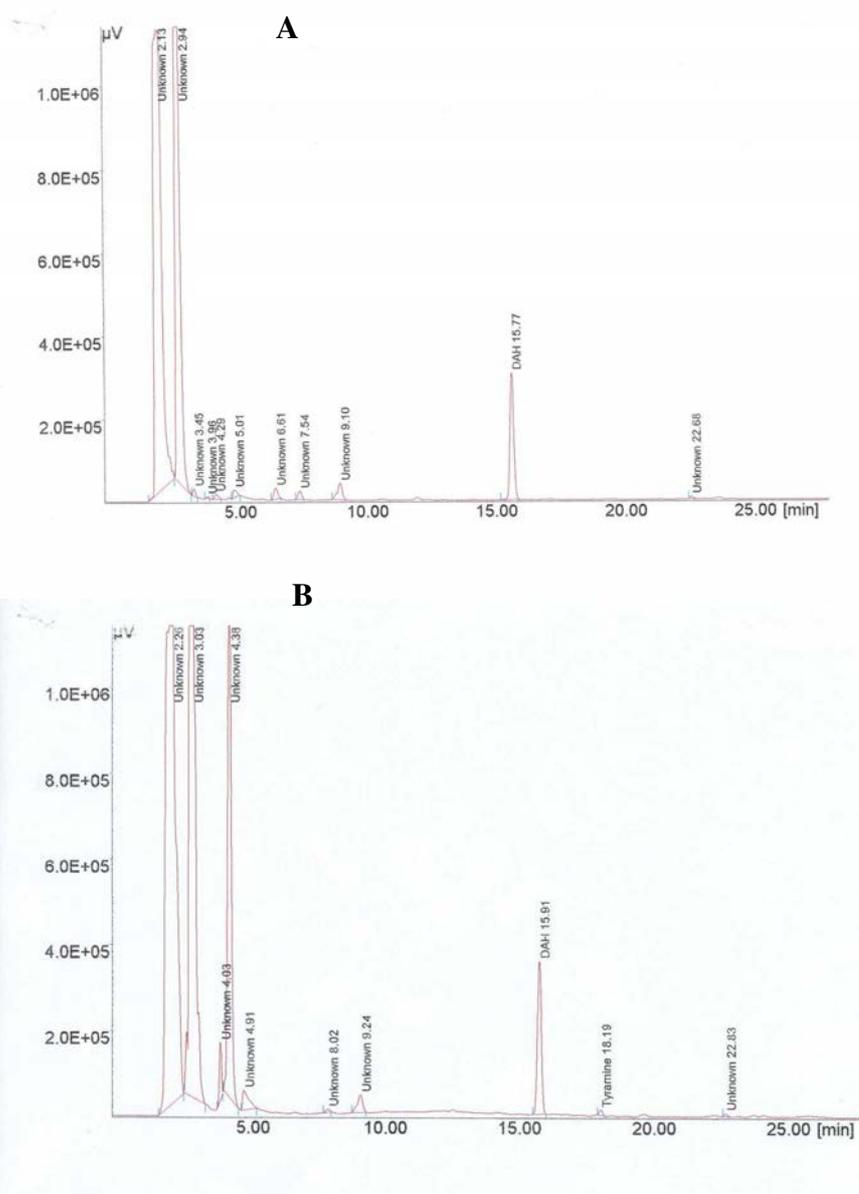
Dans les fromages, la dégradation de la caséine est la principale voie de formation des composés aromatiques, car la protéolyse et la peptidolyse sont des prérequis pour la dégradation d'acides aminés libres. Cependant, la présence des acides aminés libres dans un aliment peut aussi conduire à la production d'amines biogènes par les décarboxylases bactériennes. Il s'avère donc important d'évaluer la production d'amines biogènes notamment de la tyramine et de l'histamine par *C. maltaromaticum* LMA 28, *Lc. lactis* DSM 20481 et *S. thermophilus* INRA 302 dans nos conditions expérimentales.

## V.2. RECHERCHE DE LA TYRAMINE ET DE L'HISTAMINE

La recherche de la tyramine et de l'histamine a été réalisée dans du lait stérilisé UHT demi-écrémé, supplémenté ou non avec 2 mM de leucine, 2mM de pyridoxal-5-phosphate et 10 mM d'acide- $\alpha$ -cétoglutarique, ainsi que dans les fromages « Petit suprême vitalité ».

Les laits ont étéensemencés avec *C. maltaromaticum* LMA 28 ou avec *Lc. lactis* DSM 20481, puis incubés à 30 °C pendant 25 h, ou ont étéensemencés avec *S. thermophilus* INRA 302, puis incubés à 37 °C pendant 25 h. Les fromages ont été fabriqués au sein du département R&D du groupe Bongrain-Gérard S.A.S. Le lait de fabrication a étéensemencé avec le levain lactique commercial Flora Danica® et avec une culture de *C. maltaromaticum* LMA 28 afin d'atteindre une population finale de cette souche d'environ 1.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>. Les fromages ont été prélevés à J<sub>20</sub> après affinage à 4 °C et stockage à -25 °C pendant un an. Le dosage de ces deux amines, réalisé au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle de l'ENITIAA de Nantes, a montré leur absence dans nos conditions expérimentales (Figure 40).

Ces résultats diffèrent de ceux de Leisner *et al.* (1994) et de Masson *et al.* (1996) qui avaient montré que *C. maltaromaticum* produisait de la tyramine dans du poisson emballé sous vide et dans le milieu de Maijala (1993) supplémenté avec 2 % (p/v) de tyrosine. L'espèce *C. maltaromaticum* possède donc une tyrosine décarboxylase. De même, les activités des enzymes tyrosine-, histidine-, tryptophane- et décarboxylases ont été mentionnées chez *Lc. lactis* par Falkow (1958) et De Liano *et al.* (1998).



**Figure 40:** Profil chromatographique (HPLC) du lait ensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 et de fromages contenant *C. maltaromaticum* LMA 28. Les amines dansylées ont été détectées à 254 nm par chromatographie liquide en phase inverse (Waters, F) ; (DAH  $\equiv$  1-7 diaminoheptane, étalon interne) ; **A** : lait + leucine + pyridoxal-5-phosphate + acide  $\alpha$ -cétoglutarique, ensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 ; **B** : fromage à J<sub>20</sub>

Cette recherche doit être absolument poursuivie en vue de comparer la production d'amines biogènes par *C. maltaromaticum* avec celles obtenues par d'autres bactéries lactiques traditionnelles. Outre la détection de la tyramine et de l'histamine, la mise en évidence d'autres amines (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, phényléthylamine et tryptamine) doit être réalisée dans les laits et dans des fromages dont le lait de fabrication a étéensemencé avec cette espèce. Ces résultats devraient permettre de confirmer le statut « GRAS » de cette souche, par une production de ces composés indésirables à un niveau faible et/ou identique à celui obtenu avec d'autres bactéries lactiques plus conventionnelles.

➤ Dans le bouillon de laboratoire TSB-YE, *C. maltaromaticum* LMA 28 dégrade la leucine, l'isoleucine et la valine afin de produire respectivement le 3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal et le 2-méthylpropanal. Elle possède donc les enzymes leucine, isoleucine et valine transaminases, avec une forte activité de la leucyl-transaminase. Dans le lait, *C. maltaromaticum* LMA 28 produit du 3-méthylbutanal (6,6 µM) et du 2-méthylpropanal (5 µM). L'ajout de 2 mM de leucine augmente de 13 fois la concentration en 3-méthylbutanal et de 2 fois celle en 2-méthylpropanal. L'addition de 2 mM d'isoleucine donne une concentration de 23 µM de 2-méthylbutanal et de 3,5 µM de 2-méthylpropanal, tandis que celle de 2 mM de valine entraîne la formation exclusive du 2-méthylpropanal à une concentration quatre fois supérieure à celle du lait témoin. Comme observé dans le milieu TSB-YE, la production du 3-méthylbutanal dans le lait, est plus importante que celle des deux autres aldéhydes. Sa production est maximale lorsque la leucine est associée avec les deux co-facteurs (pyridoxal-5-phosphate et acide α-cétoglutarique). La souche *Lc. lactis* DSM 20481 produit plus de 3-méthylbutanal que *C. maltaromaticum* LMA 28 lorsque le lait est additionné des précurseurs d'arôme puis neutralisé à pH 7,0. *S. thermophilus* INRA 302 n'en produit pas dans nos conditions expérimentales. Le dosage de la tyramine et de l'histamine dans nos conditions expérimentales a montré leur absence.



**Chapitre VI. Aptitude fromagère de  
*C. maltaromaticum* LMA 28**



## VI.1. APTITUDE FROMAGÈRE DE *C. MALTAROMATICUM* LMA 28

### VI.1.1. Analyses bactériologiques des fromages

#### VI.1. 1.1. Les «Petit suprême vitalité », fabrication du 10 mai 2005

Lors de la fabrication des «Petit suprêmes vitalité », le comportement de *C. maltaromaticum* LMA 28 a été suivi au cours des différentes phases de la fabrication jusqu'à 42 jours, date limite de vente (DLV). Après affinage à 10 °C pendant 10 jours, les fromages ont été stockés à 12 ou à 4 °C jusqu'à leur DLV.

La recherche de *C. maltaromaticum* LMA 28, en utilisant le milieu sélectif CM, montre que les fromages de l'essai témoin, non ensemencés avec *C. maltaromaticum* LMA 28, sont contaminés par cette souche à partir du 21<sup>ème</sup> jour d'affinage à 12 °C et du 27<sup>ème</sup> jour à 4 °C avec des populations respectivement de  $6,0 \cdot 10^2$  et de  $1,4 \cdot 10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage. La population en *C. maltaromaticum* LMA 28 augmente ensuite régulièrement pendant le stockage au froid pour atteindre respectivement  $5,2 \cdot 10^8$  (12 °C) et  $7,6 \cdot 10^6$  ufc.g<sup>-1</sup> (4 °C) de fromage au 42<sup>ème</sup> jour d'affinage. Dans les essais A (1 log<sub>10</sub> de *C. maltaromaticum* LMA 28 lors de l'ensemencement du lait de fabrication), B (4 log<sub>10</sub>) et C (7 log<sub>10</sub>), la population augmente jusqu'à un maximum de  $2,3 \cdot 10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage au 35<sup>ème</sup> jour d'affinage. L'analyse de ces fromages montre également des contaminations microbiennes non identifiées (Tableau 32). En effet, des colonies rosées plus ou moins muqueuses et brillantes (courts bacilles Gram-positifs, catalase +) sont détectées sur tous les fromages. Leur nombre augmente avec la durée de stockage. De petites colonies de couleur orange (catalase +, bacilles Gram-positifs) sont également mises en évidence. L'identification éventuelle à l'espèce *Brevibacterium linens* n'a pas été réalisée.

**Tableau 32:** Comportement de *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 dans les fromages au cours de l'affinage.

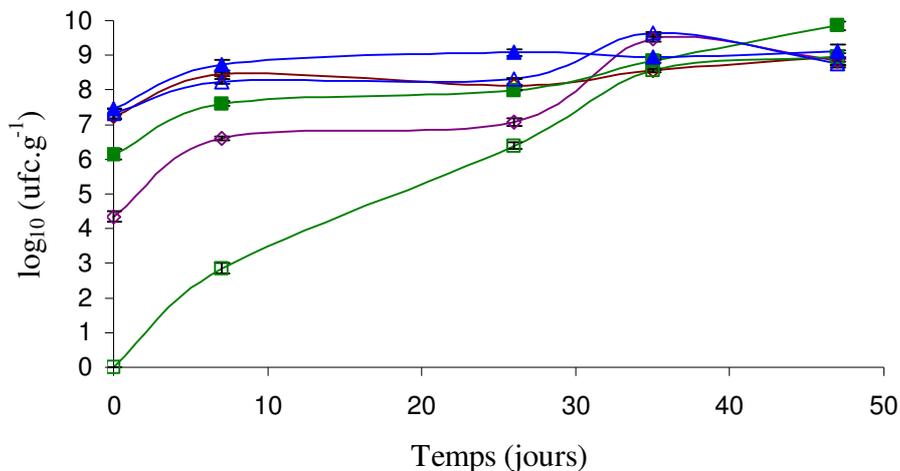
durée d'affinage (J)	Températures d'affinage (°C)	Numération flore totale /g <sup>\$</sup>	Numérations des essais de fabrication <sup>\$\$</sup>			
		Témoin	Témoin	A	B	C
0		2,43.10 <sup>8</sup> *	<200 *	585 **	1,00.10 <sup>4</sup> *	5,40.10 <sup>7</sup> *
1		1,43.10 <sup>9</sup> *	<200 *	450 **	5,30.10 <sup>4</sup> *	1,80.10 <sup>7</sup> *
	10					
6		1,23.10 <sup>9</sup> *	<200 *	1,6.10 <sup>3</sup> **	7,20.10 <sup>5</sup> *	1,32.10 <sup>8</sup> *
9		3,26.10 <sup>9</sup> *	<200 *	7,4.10 <sup>3</sup> *	1,54.10 <sup>7</sup> *	1,62.10 <sup>8</sup> *
20	4	1,48.10 <sup>8</sup> *	< 200 *	7,60.10 <sup>5</sup> *	8,77.10 <sup>6</sup> *	5,80.10 <sup>6</sup> *
	12	4,40.10 <sup>7</sup> *	600 *	6,81.10 <sup>6</sup> *	1,40.10 <sup>7</sup> *	1,80.10 <sup>7</sup> *
27	4	6,95.10 <sup>7</sup> *	1,40.10 <sup>5</sup> *	9,24.10 <sup>7</sup> *	1,80.10 <sup>8</sup> *	1,70.10 <sup>8</sup> *
	12	1,21.10 <sup>8</sup> *	3,38.10 <sup>6</sup> *	1,68.10 <sup>8</sup> *	1,98.10 <sup>8</sup> *	3,33.10 <sup>8</sup> *
35	4	2,04.10 <sup>8</sup> *	2,38.10 <sup>6</sup> *	2,94.10 <sup>8</sup> *	1,02.10 <sup>8</sup> *	1,26.10 <sup>9</sup> *
	12	3,06.10 <sup>9</sup> *	1,76.10 <sup>8</sup> *	8,80.10 <sup>8</sup> *	5,60.10 <sup>9</sup> *	2,30.10 <sup>9</sup> *
42	4	2,69.10 <sup>9</sup> *	7,60.10 <sup>6</sup> *	2,02.10 <sup>8</sup> *	1,99.10 <sup>8</sup> *	2,84.10 <sup>8</sup> *
	12	2,04.10 <sup>9</sup> *	5,20.10 <sup>8</sup> *	1,20.10 <sup>8</sup> *	4,67.10 <sup>8</sup> *	5,37.10 <sup>8</sup> *

<sup>\$</sup>: TSA-YE à pH 6,80 ; <sup>\$\$</sup>: MCM + Amphotéricine B (5 mg.L<sup>-1</sup>) ; témoin : fromage sans *C. maltaromaticum* LMA 28 ; A, B et C : fromages obtenus par ensemencement de *C. maltaromaticum* LMA 28 pour des concentrations finales respectivement de 1.10<sup>1</sup>, 1.10<sup>4</sup> et 1.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>; \* numération obtenue à l'aide de l'ensemencement spiral (50µL d'inoculum) ; \*\* : numération par la méthode par inclusion d'un mL de la dilution -1. Moyenne de trois essais indépendants, écart type ≤ 0,05.

#### VI.1.1.2. « Le Montagnard » fabrication du 25 avril 2007

En fabrication de fromage « Le Montagnard », *C. maltaromaticum* LMA 28 a été suivi lors des différentes phases de fabrication jusqu'à 47 jours. Après affinage à 10 °C pendant 10 jours, les fromages ont été stockés à 4 °C.

La recherche de *C. maltaromaticum* LMA 28, en utilisant le milieu sélectif CM, montre que les fromages de l'essai nonensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28 (témoin) sont contaminés par cette souche à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'affinage à 12 °C. La population de  $7,2 \cdot 10^2$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage augmente ensuite régulièrement pendant le stockage jusqu'à un maximum de  $8,7 \cdot 10^8$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage au 47<sup>ème</sup> jour. Dans les essais 1 (4 log<sub>10</sub> de *C. maltaromaticum* LMA 28 lors de l'ensemencement du lait de fabrication) et 2 (7 log<sub>10</sub>), la population augmente jusqu'à un maximum de  $6,7 \cdot 10^8$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage au 47<sup>ème</sup> jour d'affinage, valeur quasi identique à celle obtenue avec l'essai témoin (Figure 41).



**Figure 41:** Suivi de *C. maltaromaticum* LMA 28 et de la flore totale mésophile dans les fromages dits « Montagnard » pendant l'affinage à 12 °C et le stockage à 4 °C. Population en *C. maltaromaticum* LMA 28 : (□) : fromage témoin ; (◇) : fromage 1 ; (△) : fromage 2 ; population en flore mésophile totale : (■) : fromage témoin ; (◆) : fromage 1 ; (▲) : fromage 2. Moyenne de trois essais indépendants.

La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 est capable de se développer pendant l'affinage à 10 °C, mais également pendant le stockage à 4 °C. Un niveau de population d'environ  $1 \cdot 10^8$  ufc.g<sup>-1</sup> est d'autant plus rapidement atteint que l'ensemencement du lait de fabrication avait été important. L'essai témoin, à l'origine nonensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28, subit une contamination croisée observée à 35 jours pour les « Petit suprêmes vitalité » et à 47 jours pour « Le Montagnard » ; sa population est alors respectivement de  $1,8 \cdot 10^8$  et de  $6,7 \cdot 10^8$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage, valeur qui représente seulement environ 6 % de la population observée sur TSA-YE à pH 6,80. Bien que les conditions de fabrication aient été conduites avec le maximum de soin, des contaminations croisées sont donc possibles. Il serait nécessaire de travailler dans des conditions non « industrielles », au sein du laboratoire, notamment pour la conduite de l'affinage. Ces contaminations

fortuites ne sont pas identiques sur tous les fromages d'une même cuve, ce qui entraîne des biais dans des niveaux de population et dans les résultats des tests d'évaluation.

## VI.1.2. Analyse sensorielle de fromages

### VI.1.2.1. Les « Petit suprêmes vitalité »

Les séances de dégustation des « Petit suprêmes vitalité » se sont déroulées dans l'entreprise (Bongrain-Gérard SAS), dans des conditions non normalisées, par un panel de dégustateurs non entraîné mais habitué à la dégustation de leurs fromages. Les résultats indiquent une différence nette entre les produits stockés à 12 °C et ceux stockés en réfrigération (+ 4 °C). Ces derniers sont toujours meilleurs avec peu ou pas de défauts, plus ou moins perceptibles.

Les descripteurs caractérisant les défauts, lors de ces séances de dégustation, sont rapportés dans le tableau 33. La fiche technique utilisée lors des séances de dégustation est placée en annexe.

**Tableau 33** : Défauts perçus lors de la dégustation des fromages à J<sub>20</sub> par 8 juges

Températures de stockage (°C)	Niveau d'inoculation en <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 (ufc.mL <sup>-1</sup> de lait de fabrication)			
	témoin	1.10 <sup>1</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>7</sup>
12	Vomi (1)	Vomi (1)	Ammoniac (1)	
	Ammoniac (1)	Ammoniac (2)	Moisi (1)	Vomi (1)
	Amertume (2)	Champignon (1)		Ammoniac (2)
	Champignon (1)	Rance (2)		Sulfuré (2)
		Lipolyse (1)		

(x): nombre de juges ayant observé ce caractère. Le jury comprenait huit juges. Les juges n'ont pas trouvé de défauts sur les fromages stockés à 4 °C.

A J<sub>20</sub>, le stockage à 12 °C est préjudiciable à la qualité du produit au niveau de la texture et de la flaveur. Avec un stockage à 4 °C, les fromages contenant à l'origine *C. maltaromaticum* LMA 28 sont mieux appréciés que ceux de l'essai témoin. Ces fromages se comportent très bien lors du stockage et ont une note « beurre » appréciée. La flaveur « maltée » a été détectée par deux juges dans les fromages contenant à l'origine environ 1.10<sup>7</sup> ufc.mL<sup>-1</sup> (essai 3) de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans le lait de fabrication et

stockés à 4 °C. Globalement, la présence de *Carnobacterium*, quel que soit le niveau d'inoculation, tend à améliorer la saveur du fromage. Les fromages, contenant environ  $1.10^7$  ou  $1.10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> de lait de fabrication de *C. maltaromaticum* LMA 28 et stockés à 4 °C, sont les plus appréciés. Le stockage au froid limite les défauts dus à un excès de maturation. Ainsi, la présence de *C. maltaromaticum* LMA 28 améliorerait leur vieillissement.

**A J<sub>34</sub>**, le vieillissement des fromages entraîne des modifications non appréciées, notamment lors du stockage à 12 °C. Le stockage à 4 °C est le seul à retenir. La présence de *C. maltaromaticum* LMA 28 limite l'apparition des défauts. Les fromages contenant cette souche sont globalement plus appréciés que ceux de l'essai témoin, n'en contenant pas. Le petit format des fromages accélère l'affinage par un rapport surface sur volume important. Le goût des fromages contenant *C. maltaromaticum* LMA 28 est moins agressif (piquant). Ces fromages sont encore appréciés malgré une durée de stockage importante. Des concentrations en *C. maltaromaticum* LMA 28, dans le lait de fabrication, supérieures à  $1.10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup>, seraient à retenir dans de futures expérimentations.

**A J<sub>42</sub>** les résultats confirment encore les observations précédentes. Sur ces fromages relativement vieux, les conditions de stockage, à 12 ou à 4 °C, jouent un rôle prépondérant. Le stockage à 12 °C accélère notablement le vieillissement ; la surface des fromages est recouverte d'un feutrage mycélien blanc ponctué de tâches brunes à orangé, notamment sur les arêtes. Ce défaut est d'autant moins marqué que la concentration initiale en *C. maltaromaticum* LMA 28 est plus importante. A 4 °C, l'aspect extérieur des fromages reste acceptable. Le feutrage mycélien est blanc et recouvre la totalité de la surface. Les quelques tâches brunes à orangé sont d'autant plus visibles que les fromages contiennent moins de *C. maltaromaticum* LMA 28. Cette souche exercerait donc un rôle bénéfique en retardant le vieillissement du fromage, éventuellement par limitation de la croissance d'autres flores d'affinage, mais ce point reste à vérifier.

La présence de *C. maltaromaticum* LMA 28, en quantités très importantes, supérieures à  $1.10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> de fromage ne provoque pas de goût désagréable, ni l'apparition des saveurs maltées ou chocolatées. Souvent cette souche diminue des défauts d'amertume, mais elle ne donne pas des produits à saveur typée.

### VI.1.2.2. « Le Montagnard »

Les séances d'évaluation sensorielles du fromage « Le Montagnard » se sont déroulées dans la société Bongrain-Gérard SAS et dans la salle d'analyse sensorielle du LSGA. Les tests triangulaires ont été réalisés dans les conditions normalisées, avec un panel entraîné. Les résultats n'indiquent aucune différence significative entre les produits après 35 et 47 jours de stockage en réfrigération (4 °C).

Au cours de cette fabrication « thermophile », deux bactéries lactiques d'intérêt technologique, *S. thermophilus* et *Lc. lactis*, une bactérie lactique non conventionnelle, *C. maltaromaticum* et une flore d'affinage composée de *Saccharomyces serwazii*, *Brevibacterium linens*, *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti* ont été utilisées. La diversité et le nombre élevé de cette flore microbienne ont permis la production de nombreux composés aromatiques ; ceci a empêché de quantifier et éventuellement d'apprécier la contribution propre de *C. maltaromaticum* LMA 28.

La réalisation de ces fromages, dans des conditions industrielles, mais non dans des conditions extrêmement rigoureuses comme au laboratoire, montre des contaminations microbiennes par le matériel et par l'environnement. Dans les essais témoins, *C. maltaromaticum* LMA 28 est détecté dès le 21<sup>ème</sup> jour dans des « Suprêmes vitalité » et dès 7<sup>ème</sup> jours dans « le Montagnard », puis sa population augmente régulièrement pendant le stockage.

Pour tenter de préciser le rôle de *C. maltaromaticum* dans les fromages, il conviendrait de choisir des fabrications fromagères ne nécessitant pas une étape d'affinage par des flores microbiennes complexes. Une proposition serait de réaliser des fromages à pâte pressée non cuite, type « St Paulin », dont la surface serait protégée par un film en matière plastique. L'affinage pourrait être effectué sous vide partiel. De ce fait, en l'absence de contamination, seules les bactéries lactiques conventionnelles (*S. thermophilus* et/ou *Lc. lactis*) et la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 contribueraient à l'affinage. L'identification des composés aromatiques et la détermination de leurs concentrations pourraient alors être réalisées.

➤ Même présente à des niveaux de population élevés ( $10^9$  ufc.g<sup>-1</sup>), la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 ne confère aucun goût désagréable au fromage « Petit suprême vitalité ». Sa présence massive dans le lait de fabrication permettrait de ralentir le vieillissement des fromages en limitant l'apparition de défauts comme le goût de rance et l'amertume. Les saveurs typées, maltées ou chocolatées, n'ont pas été décelées. Les fromages « Petit suprême vitalité » contenant *C. maltaromaticum* LMA 28 présentent globalement moins de défauts d'aspect et de goût que ceux réalisés uniquement avec le levain *Flora Danica*<sup>®</sup>. Dans ces fromages, la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 n'entrave pas la croissance de *Penicillium camemberti* et de *Geotrichum candidum*. Dans les fromages « Le Montagnard », la diversité et le nombre élevé de la flore bactérienne utilisée pour cette fabrication « thermophile » ont empêché de quantifier et d'apprécier la contribution propre de *C. maltaromaticum* LMA 28. De plus, l'essai témoin a subi une contamination par cette souche, ce qui a rendu difficile toute comparaison.



## **Conclusion générale**



## 1. Choix de la souche d'intérêt

La présence de *C. maltaromaticum* a été montrée de façon quasi permanente dans certains fromages à pâte molle, fabriqués à partir de lait cru de vache, de brebis ou de chèvre (Millière *et al.*, 1994 ; Cailliez-Grimal *et al.*, 2005). Ses niveaux de population sont quelquefois très élevés en fin d'affinage en raison de valeurs de pH basiques, favorables à sa croissance, et en raison de périodes de stockage relativement longue en réfrigération. Cette espèce lactique n'est pas commercialisée en tant que levain pour les industries alimentaires de fermentation. Sa présence dans des fromages est en relation avec son habitat (herbe, fourrages) et à certaines étapes de la fabrication, affinage puis stockage au froid, qui la favorisent.

Les souches issues de différents fromages, dénommées *C. maltaromaticum* LMA 28, *C. maltaromaticum* « Pérail », *C. maltaromaticum* « Réo », et la souche de collection publique isolée d'une truite arc-en-ciel malade, *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, caractéristique de l'espèce, possèdent des propriétés métaboliques différentes. En culture dans le lait, la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 est la plus performante en terme de croissance bactérienne et d'acidification. Cette souche avait été précédemment sélectionnée dans des essais de fabrication fromagère parmi d'autres souches de cette espèce, mais également parmi des souches des espèces *C. divergens* et *C. gallinarum*. Les dégustations de ces fromages de petit format (25 g) avaient montré l'absence de défaut dans les fromages contenant en proportions importantes ( $10^8$ - $10^9$  ufc.g<sup>-1</sup>) la souche *C. maltaromaticum* LMA 28. Les souches « Pérail » et « Réo » ne possèdent pas de propriétés physiologiques leur permettant une bonne adaptation au substrat lait, mais comme *C. maltaromaticum* LMA 28, ne sont pas à l'origine de défaut de flaveur ou de texture dans les fromages AOC.

Certainement présentes à un niveau très faible de population dans le lait cru, l'espèce *C. maltaromaticum* est donc capable progressivement de devenir la flore lactique dominante dans des fromages affinés. Des analyses sensorielles sur des fromages à J<sub>+42</sub> avaient montré un ralentissement dans l'apparition des flaveurs liées au vieillissement et une meilleure acceptation globale du produit. Ces résultats ont conduit à analyser le comportement de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 dans le lait et à tenter d'améliorer ses performances technologiques.

## 2. Performances acidifiantes de *C. maltaromaticum* LMA 28

En fin de culture pure dans le TSB-YE, la biomasse maximale est d'environ  $1-2 \cdot 10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>, résultat comparable à celui obtenu avec d'autres bactéries lactiques. Cependant, cette biomasse dans le lait n'est que d'environ  $1 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> après 25 h d'incubation à 30 °C. La souche *C. maltaromaticum* LMA 28 possède une  $\beta$ -galactosidase, hydrolyse lentement le lactose sans obtention d'un caillé à 30 °C après 25 h d'incubation. L'augmentation du taux d'ensemencement permet une cinétique d'acidification plus rapide, notamment lorsque le lait contient à l'origine  $1 \cdot 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> de cellules bactériennes préalablement lavées. Ce niveau très élevé de population n'est pas envisageable en fabrication fromagère, en raison de son coût. De plus, une association avec les souches lactiques habituelles (*Lc. lactis*) est absolument indispensable pour obtenir la coagulation du lait. L'activation de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 n'est possible que par ajout d'extrait de levure, substrat contenant des acides aminés et des peptides indispensables à sa croissance. Cet ajout ou celui d'activateurs de levains commerciaux ne peut être envisagé que dans le cas de la fabrication de levains, mais pas directement dans le lait de fabrication même s'ils sont ajoutés en faible proportion. Outre le coût prohibitif, ces ajouts sont interdits et confèreraient un goût particulier aux produits obtenus. La fabrication de levains associant *C. maltaromaticum* et des souches lactiques n'est pas envisageable ; en effet, après une première culture, cette espèce n'est plus dominante car elle est entravée dans sa croissance par des souches beaucoup plus rapides et acidifiantes. En effet, la production importante d'acide lactique par des souches lactiques conventionnelles exerce un rôle inhibiteur sur cette souche faiblement acidotolérante. L'abaissement de la température d'incubation (25 °C), paramètre favorable, n'est pas compatible avec les impératifs de temps fixés en fromagerie.

La seule stratégie pour l'action optimisée de *C. maltaromaticum* LMA 28 serait de préparer des cultures denses par pré-culture en TSB-YE puis lavage des cellules afin de pouvoir optimiser la densité cellulaire de l'inoculum bactérien ou de préparer des cellules lyophilisées. Les taux d'ensemencement des autres bactéries lactiques ne seraient pas modifiés. Le levain *C. maltaromaticum* LAM 28 pourrait également être utilisé préalablement à la fabrication fromagère lors de la maturation des laits (15 °C-10 h) afin d'occuper le « terrain ». Les souches d'intérêt technologique seraient ensuite inoculées dans le lait dans les conditions habituelles. Nos essais n'ont pas permis de suivre, lors des

cultures mixtes dans le lait, les cinétiques de croissance de cette souche. De plus, il aurait été intéressant de déterminer les variations des concentrations en acides aminés. Une autre méthode aurait été d'ajouter au lait de fabrication un culot cellulaire préalablement broyé (cellules mortes). Cet ajout massif et immédiat d'enzymes pourrait modifier plus intensément l'aromatisation des fromages.

### **3. Inconvénients de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28**

Cette souche présente un certain nombre d'inconvénients ou de « verrous » qu'il est difficile de lever ou de modifier, comme son exigence nutritionnelle et son acidification très lente et peu prononcée. Un autre inconvénient est lié à son incapacité à fermenter le galactose. Cet hexose, issu de l'hydrolyse du lactose, va donc être présent dans le lait à une concentration molaire identique à celle du lactose métabolisé. Contrairement aux essais réalisés avec *S. thermophilus*, la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 n'excrète pas le galactose dans le milieu extérieur. Le devenir du galactose n'a pu être analysé plus avant. Des essais devraient confirmer ou infirmer ce résultat paradoxal par le dosage d'enzymes intervenant dans sa dégradation ou par l'emploi de lactose marqué sur la fraction galactose. Ce point est important pour la caractérisation d'une nouvelle « souche fromagère » car le galactose accumulé peut conduire à des phénomènes de post-acidification par d'autres micro-organismes et modifier défavorablement la conduite de l'affinage.

### **4. Réponse de *C. maltaromaticum* LMA 28 au stress acide**

Parallèlement à nos travaux, des études ont débuté sur l'effet d'un stress acide sur cette souche. Le but est de déterminer les relations entre les valeurs de pH acides (acide lactique ou acide chlorhydrique) et son taux de survie. Globalement, pour une même valeur acide de pH (3,5), le taux de survie est beaucoup plus faible en présence d'acide lactique. Ce résultat pourrait être dû à un ajout plus important de moles d'acide lactique que de moles d'acide chlorhydrique. Après incubation à pH 4,0 (acide chlorhydrique), cette souche n'a pas montré d'adaptation à cette condition acide jusqu'à 120 min par transfert dans des bouillons TSB-YE à pH 3,5 et à pH 3,2, suivi d'une incubation entre 0 et 2 h. L'objectif est d'obtenir des colonies bactériennes dont la résistance au stress acide est stable afin d'analyser les modifications provoquées au niveau génétique. Cette étude permettrait d'identifier les gènes impliqués dans la réponse au stress acide afin d'obtenir des cellules

bactériennes plus acidotolérantes. Cependant, ces souches ne posséderaient peut-être pas une activité acidifiante plus rapide et leur capacité aromatique pourrait être perturbée.

### 5. Aptitude fromagère de *C. maltaromaticum* LMA 28

Deux fabrications fromagères ont été réalisées dans des conditions industrielles en vue de fabriquer deux types de pâte molle du groupe Bongrain « les Suprêmes vitalité » et « Le Montagnard ». Des essais avaient été réalisés sans ajout de *C. maltaromaticum* LMA 28 (essai témoin) ou avec des concentrations d'environ  $1.10^4$  ou  $1.10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans le lait de fabrication. Les objectifs étaient de suivre les modifications physico-chimiques résultant de la présence de cette souche et de réaliser des dégustations en vue notamment de rechercher une saveur maltée. La mise au point du milieu sélectif de numération MCM et l'optimisation des conditions opératoires de PCR ont permis de suivre le comportement de *C. maltaromaticum* LMA 28 dans une matrice fromage. Il n'a pas été matériellement possible de suivre l'évolution de toutes les flores (flores lactiques totales) et *C. maltaromaticum* pendant toutes les étapes de la fabrication. Nos résultats ont malheureusement mis en évidence des contaminations croisées entre les différents essais. L'essai témoin, sans *C. maltaromaticum* LMA 28 à l'origine a été très rapidement « contaminé » par cette souche. Cette expérimentation a toutefois permis de montrer que *C. maltaromaticum* LMA 28 pourrait très rapidement coloniser un fromage et devenir en fin d'affinage la flore lactique dominante. De ce fait, les comparaisons gustatives des fromages ont été difficiles, car tous contenaient cette flore, et ce d'autant plus que la durée d'affinage était importante. La comparaison avec un essai dit « témoin » était impossible. Cette « contamination » a pu intervenir très rapidement lors de l'égouttage des fromages. Il aurait été opportun de réaliser ces essais dans des conditions de laboratoire plus strictes, afin d'éviter au maximum tout transfert de souches entre les fromages. Il est intéressant de noter que les fabrications industrielles ne contiennent pas cette souche, qui ne s'est donc pas propagée dans l'entreprise. Des analyses de fromages AOC du commerce ont montré que certains contenaient plus de  $1.10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum*. Les tests triangulaires retenus lors de deux analyses sensorielles ont montré la difficulté des juges à différencier les échantillons de fromages proposés et ce d'autant plus que tous en contenaient. Des tests d'acceptabilité ont montré que tous les fromages étaient acceptables sur l'aspect et le goût. Comme déjà observé, et sa présence dans les AOC le confirme, *C. maltaromaticum* n'est pas indésirable, mais quel bénéfice pourrait-il conférer au produit ?

La mise en évidence d'activités lipolytique et protéolytique de *C. maltaromaticum* LMA 28 à l'aide des tests qualitatifs, gélose au bleu de Nil et gélose au lait n'a pas montré de différences importantes avec celles des souches lactiques témoins. Une étude plus approfondie de ces activités aurait été nécessaire notamment pour caractériser les différentes activités peptidasiques (amino et carboxy) présentes. Des dosages des différentes formes d'azote, en culture dans le lait (azote total, azote soluble, azote non protéique) auraient permis de mieux caractériser ces activités en fonction du pH et de la température. Des dosages d'amines biogènes sur les laits fermentés additionnés ou non avec des précurseurs d'arômes et sur des fromages n'ont pas mis en évidence une concentration significative en tyramine, principale amine produite par l'espèce *C. maltaromaticum*.

## **6. Production de composés à arôme malté par *C. maltaromaticum* LMA 28**

Les dosages des composés volatils à l'origine de saveurs maltées ont montré que *C. maltaromaticum* LMA 28 produisait exclusivement le 3-méthylbutanal et le 2-méthylpropanal dans le lait. L'ajout de 2 mM de leucine, d'isoleucine ou de valine au lait augmentait la concentration en 3-méthylbutanal, en 2-méthylbutanal et en 2-méthylpropanal. Au laboratoire, il s'avère donc nécessaire d'ajouter des précurseurs pour favoriser la production d'arôme malté. Lors des deux fabrications fromagères et à différentes étapes de l'affinage, la saveur maltée n'a jamais été identifiée. Les conditions de son obtention restent encore à découvrir puis à optimiser si ce descripteur peut ajouter une note originale, favorablement perçue par les consommateurs.

## **7. Potentialités de *C. maltaromaticum* en technologie fromagère**

Les analyses microbiologiques des fromages en cours d'affinage montrent que *C. maltaromaticum* LMA 28 possède un certain nombre d'aptitudes métaboliques qui permettraient à cette souche opportuniste « d'occuper le terrain ». Sa croissance est notamment fonction du pH et de la température. Cette souche pourrait être considérée comme un bio-indicateur de la présence potentielle de *Listeria*, genre qui possède les mêmes particularités physiologiques. De plus, l'intérêt de l'emploi de *C. maltaromaticum* serait sa lutte contre *L. monocytogenes* par la production de bactériocines (B2 et BM1) appartenant à la classe IIa. Son rôle serait ainsi bénéfique en technologie fromagère. En

effet, cette souche n'intervient pas lors des premières étapes de la fabrication (coagulation, égouttage) où l'acidification crée une barrière sanitaire empêchant la multiplication de *L. monocytogenes*. Lorsque les conditions deviennent favorables, par neutralisation puis faible alcalinisation du fromage, notamment de sa surface, *C. maltaromaticum* pourrait contrecarrer la pousse de *L. monocytogenes*. Pour les fromages à croûte lavée, son ajout pourrait être envisagé lors du lavage et du frottage en association avec *Brevibacterium linens* et *Arthrobacter* sp.

En conclusion, cette flore « opportuniste » n'est pas gênante et ne provoque pas de déclassement des fromages. Son intérêt technologique résiderait dans le ralentissement du vieillissement et la protection des fromages contre *L. monocytogenes*. Au plan gustatif, son impact reste très faible, si non nul, dans nos conditions expérimentales. Non toxique, cette souche pourrait être considérée comme « Generally Recognized As Safe (GRAS) » et proposée en tant que levain lactique bio-protecteur, jouant son rôle essentiellement lors de l'affinage et du stockage au froid, avant commercialisation des fromages à pâte molle.

## **Références bibliographiques**



-A-

**AFNOR V. 09 003 (1988)** Analyse sensorielle Guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets qualifiés.

**Aquirre M. and M. D. Collins (1993)** Lactic acid bacteria and human infection. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**, 95-107.

**Ardo Y. (2006)** Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*. **24**, 2, 238-242.

**Avsar Y. K., Y. Karagul-Yuceer, M. A. Drake, T. K. Singh, Y. Yoon and K. R. Cadwallader (2004)** Characterization of Nutty Flavour in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*. **87**, 7, 1999-2010.

**Ayad E. H. E., A. Verheul, P. Bruinenberg, J. T. M. Wouters and G. Smit (2003)** Starter culture development for improving the flavour of Proosdij-type cheese. *International Dairy Journal*. **13**, 2-3, 159-168.

**Ayad E. H. E., A. Verheul, C. de Jong, J. T. M. Wouters and G. Smit (1999)** Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*. **9**, 10, 725-735.

**Ayad E. H. E., A. Verheul, J. T. M. Wouters and G. Smit (2001)** Population dynamics of *lactococci* from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. *International Dairy Journal*. **11**, 1-2, 51-61.

**Ayad E. H. E., A. Verheul, J. T. M. Wouters and G. Smit (2002)** Antimicrobial-producing wild *lactococci* isolated from artisanal and non-dairy origins. *International Dairy Journal*. **12**, 2-3, 145-150.

-B-

**Barakat R. K., M. W. Griffiths and L. J. Harris (2000)** Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*. **62**, 1-2, 83-94.

**Bardocz S. (1993)** The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition*. **47**, 10, 683-90.

**Baya A. M., A. E. Toranzo, B. Lupiani, T. Li, B. S. Roberson and F. M. Hetrick (1991)** Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 11, 3114-3120.

**Bhugaloo-Vial P., J.-P. Douliez, D. Molle, X. Dousset, P. Boyaval and D. Marion (1999)** Delineation of Key Amino Acid Side Chains and Peptide Domains for Antimicrobial Properties of Divercin V41, a Pediocin-Like Bacteriocin Secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 7, 2895-2900.

**Bhugaloo-Vial P., X. Dousset, A. Metivier, O. Sorokine, P. Anglade, P. Boyaval and D. Marion (1996)** Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 12, 4410-4416.

**Bjeldanes L. F., D. E. Schutz and M. M. Morris (1978)** On the aetiology of scombroid poisoning: Cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food and Cosmetics Toxicology*. **16**, 2, 157-159.

- Block S. S. (1991)** Peroxygen compound. In: disinfection, sterilization and preservation. ed. *Lea and Feabiger, Philadelphia*. pp 169-180.
- Blom H, K. T, Nissen H and H. Holo (2001)** Characterization, production, and purification of carnocin H, a bacteriocin produced by *Carnobacterium* 377. *Current Microbiology*. **43**, 4, 227-231.
- Booth J. R. (1985)** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*. **49**, 359-364.
- Brillet A., M. F. Pilet, H. Prevost, A. Bouttefroy and F. Leroi (2004)** Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*. **97**, 5, 1029-1037.
- Brillet A., M.-F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal and F. Leroi (2005)** Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. **104**, 3, 309-324.
- Bryskier A. (1999)** Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. ed. *Ellipses Marketing*. 1216 pages.
- Buchanan R. L. and L. A. Klawitter (1991)** Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. **12**, 2-3, 235-245.

-C-

- Cailliez-Grimal C., R. Miguindou-Mabiala, M. Leseine, A. M. Revol-Junelles and J. B. Millière (2005)** Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. *FEMS Microbiology Letters*. **250**, 1, 163-9.
- Caplice E. and G. F. Fitzgerald (1999)** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **50**, 1-2, 131-149.
- Carr F. J., D. Chill and N. Maida (2002)** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**, 4, 281-370.
- Chammas G. I., R. Saliba, G. Corrieu and C. Beal (2006)** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *International Journal of Food Microbiology*. **110**, 1, 52-61.
- Collins M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu and J. D. (1987)** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**, 4, 310-316.
- Connil N., X. Dousset, B. Onno, M. F. Pilet, M. F. Breuil and M. C. Montel (1998)** Enumeration of *Carnobacterium divergens* V41, *Carnobacterium piscicola* V1 and *Lactobacillus brevis* LB62 by in situ hybridization-flow cytometry. *Letters in Applied Microbiology*. **27**, 5, 302-306.
- Corbier C., F. Krier, G. Mulliert, B. Vitoux and A. M. Revol-Junelles (2001)** Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52b and leucocin b-ta33a. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 4, 1418-22.
- Corrieu G. E. Spinnler, et D. Picque (1988)** Procédés de mise en évidence et de contrôle de l'activité acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en oeuvre. Brevet N°PUB9000001156014490, 21.
- Corsetti A., M. Gobbetti, J. Rossi and P. Damiani (1998)** Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **50**, 20, 253-256.

**Crow V., B. Curry and M. Hayes (2001)** The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*. **11**, 4-7, 275-283.

**Curioni P. M. G. and J. O. Bosset (2002)** Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*. **12**, 12, 959-984.

**-D-**

**Daeschel M. A. (1989)** Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. **43**, 164-167.

**De Angelis C. S., R. Curini, M. Delfini, E. Brosio, F. D'Ascenzo and B. Bocca (2000)** Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: a NMR study. *Food Chemistry*. **71**, 4, 495-502.

**De Angelis M and M. Gobbeti (2004)** Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*. **4**, 1, 106-122.

**De Llano D. G., Cuesta and Rodriguez (1998)** Biogenic amine production by wild lactococ and leuconostoc strains. *Letters in applied microbiology*. **26**, 4, 270-274.

**De Roissart H. (1986)** Lait et produits laitiers. Ed. *F. Luquet, Lavoisier Tec et Doc* **3**, 376.

**Doehlert D. H. (1970)** Uniform shell designs. *Applied Statistics*. **19**, 231-239.

**Duffes F., F. Leroi, P. Boyaval and X. Dousset (1999)** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4[degree sign]C. *International Journal of Food Microbiology*. **47**, 1-2, 33-42.

**-E-**

**Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E. and H. T. (1993)** Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*. **76**, 3, 575-577.

**Eklund T.. (1984)** The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*. **1**, 4, 179-185.

**Esti M., G. Volpe, L. Massignan, D. Compagnone, E. La Notte and G. Palleschi (1998)** Determination of amines in fresh and modified atmosphere package fruits using electrochemical biosensors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**, 4233-4237.

**-F-**

**Falkow S. (1958)** Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of *Salmonellae* and *Shigellae*. *American Journal of Clinical Pathology*. **29**, 6, 598-600.

**Fernandez C. F., M. K. Shahani. and M. Amer (1987)** Therapeutic role of dietary *lactobacilli* and *lactobacillic* fermented dairy products. *FEMS Microbiology Reviews*. **46**, 343-356.

**Franklin J. G. and M. E. Sharpe (1963)** The incidence of bacteria in cheesemilk and Cheddar cheese and their association with flavour. *Journal of Dairy Research*. **30**, 87-99.

**Franz C. M. A. P., M. J. van Belkum, R. W. Worobo, J. C. Vederas and M. E. Stiles (2000)** Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of *carnobacteriocin* A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology*. **146**, 3, 621-631.

**Franzmann P. D., P. Hopfl, N. Weiss and B. J. Tindall (1991)** Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archives of microbiology*. **156**, 4, 255-62.

**Fryer T. F., Lawrence R. C. and B. Reiter (1967)** Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. *Journal of Dairy Science*. **50**, 4, 477-484.

**-G-**

**Gobbetti M., B. Folkertsma, P. F. Fox, A. Corsetti, E. Smacchi, M. De Angelis, J. Rossi, K. Kilcawley and M. Cortini (1999a)** Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *International Dairy Journal*. **9**, 11, 763-773.

**Gobbetti M., R. Lanciotti, M. De Angelis, M. Rosaria Corbo, R. Massini and P. F. Fox (1999b)** Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *International Dairy Journal*. **9**, 12, 865-875.

**Guerzoni M. E., P. Vernocchi, M. Ndagijimana, A. Gianotti and R. Lanciotti (2007)** Generation of aroma compounds in sourdough: Effects of stress exposure and lactobacilli-yeasts interactions. *Food Microbiology*. **24**, 2, 139-148.

**Gunasekaran S. and A. Mehmet, M. (2000)** Dynamic oscillatory shear testing of foods -- selected applications. *Trends in Food Science & Technology*. **11**, 3, 115-127.

**-H-**

**Halasz A., A. Barath, L. Simon-Sarkadi and W. Holzapfel (1994)** Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. **5**, 2, 42-49.

**Helinck S., D. Le Bars, D. Moreau and M. Yvon (2004)** Ability of Thermophilic Lactic Acid Bacteria To Produce Aroma Compounds from Amino Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 7, 3855-3861.

**Herbin S, Mathieu F, Brulé F, Branlant C, Lefebvre G and A. Lebrihi (1997)** Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology*. **35**, 6, 319-326.

**Hiu S. F., R. A. Holt, N. Sriranganathan, R. J. Seidler and J. L. Freyer (1984)** *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **34**, 4, 394-400.

**Holck A., L. Axelsson and U. Schillinger (1996)** Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiology Letters*. **136**, 2, 163-168.

**Holck A. L., Axelsson L. and U. Schillinger. (1994)** Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiology*. **29**, 2, 63-68.

**Holley R. A., T. Y. Guan, M. Peirson and C. K. Yost (2002)** *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**, 5, 1881-5.

**Horne D. S. (1999)** Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*. **9**, 3-6, 261-268.

**Hussain M, Hastings JG and P.J. White (1991)** A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*. **34**, 3, 143-147.

**-I-**

**Innocente N., M. Biasutti, M. Padovese and S. Moret (2007)** Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. **101**, 3, 1285-1289.

-J-

**Jack R. W., J. Wan, J. Gordon, K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, R. E. Wettenhall, M. W. Hickey and M. J. Coventry (1996)** Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 8, 2897-2903.

**Jobörn A., M. Dorsch, J. C. Olsson, A. Westerdahl and S. Kjelleberg (1999)** *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49 Pt 4**, 1891-8.

**Joffraud J. J., F. Leroi, C. Roy and J. L. Berdague (2001)** Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. **66**, 3, 175-184.

**Jorgensen L. V., P. Dalgaard and H. H. Huss (2000)** Multiple Compound Quality Index for Cold-Smoked Salmon (*Salmo salar*) Developed by Multivariate Regression of Biogenic Amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**, 6, 2448-2453.

-K-

**Kabadjova P., X. Dousset, V. Le Cam and H. Prevost (2002)** Differentiation of Closely Related *Carnobacterium* Food Isolates Based on 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Region Polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 11, 5358-5366.

**Khouiti Z. and J. P. Simon (2004)** Carnocin KZ213 produced by *Carnobacterium piscicola* 213 is adsorbed onto cells during growth. Its biosynthesis is regulated by temperature, pH and medium composition. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **31**, 1, 5-10.

**Khouiti Z and J. P. Simon (1997)** Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* 213. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **19**, 1, 28-33.

**Kim B. Y. and J. E. Kinsella (1989)** Rheological changes during slow acid induced gelation of milk by D-glucono- $\delta$ -lactone. *Journal of Food Science*. **54**, 4, 894-898.

**Klandar A. (2004)** Mise au point de milieux sélectifs pour la numération et l'identification de *Carnobacterium* sp. *DEA Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. ENSAIA-INPL*.

**Kristo E., C. G. Biliaderis and N. Tzanetakis (2003)** Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal*. **13**, 7, 517-528.

**Kubickova J. and W. Grosch (1998a)** Evaluation of Flavour Compounds of Camembert Cheese. *International Dairy Journal*. **8**, 1, 11-16.

**Kubickova J. and W. Grosch (1998b)** Quantification of Potent Odorants in Camembert Cheese and Calculation of their Odour Activity Values. *International Dairy Journal*. **8**, 1, 17-23.

-L-

**Lane C. N. and P. F. Fox (1996)** Contribution of starter and adjunct *lactobacilli* to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*. **6**, 7, 715-728.

**Lane C. N. and P. F. Fox (1997)** Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*. **7**, 1, 55-63.

- Lange J. and C. Wittmann (2002)** Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **372**, 2, 276-83.
- Larrouture-Thiveyrat C. and M.-C. Montel (2003)** Effects of environmental factors on leucine catabolism by *Carnobacterium piscicola*. *International Journal of Food Microbiology*. **81**, 3, 177-184.
- Larrouture-Thiveyrat C., M. Pepin, S. Leroy-Setrin and M.-C. Montel (2003)** Effect of *Carnobacterium piscicola* on aroma formation in sausage mince. *Meat Science*. **63**, 3, 423-426.
- Larrouture C., V. Ardaillon, M. Pepin and M. C. Montel (2000)** Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology*. **17**, 5, 563-570.
- Leisner J. J., J. C. Millan, H. H. Huss and L. M. Larsen (1994)** Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. *Journal of Applied Bacteriology*. **76**, 5, 417-23.
- Leroi F., J.-J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal (1998)** Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8[degree sign]C. *International Journal of Food Microbiology*. **39**, 1-2, 111-121.
- Leuschner R. G. and W. P. Hammes (1999)**, Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by *lactobacilli*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **50**, 3, 159-64.
- Lucey J. A., M. E. Johnson and D. S. Horne (2003)** Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *Journal of Dairy Science*. **86**, 9, 2725-2743.
- Lucey J. A., P. A. Munro and H. Singh (1999)** Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*. **9**, 3-6, 275-279.
- Lucey J. A. and H. Singh (1997)** Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*. **30**, 7, 529-542.
- Lucey J. A., M. Tamehana, H. Singh and P. A. Munro (1998)** A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-[delta]-lactone. *Food Research International*. **31**, 2, 147-155.
- Lucey J. A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts and P. Walstra (1997)** Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-[delta]-lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*. **7**, 6-7, 389-397.
- Lynch C. M., P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, T. M. Cogan and F. D. Drinan (1996)** Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct *lactobacilli* under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*. **6**, 8-9, 851-867.

**-M-**

- Maijala R. L. (1993)** Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*. **17**, 40-43.
- Marilley L. and M. G. Casey (2004)** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. **90**, 2, 139-159.
- Marino M., M. Maifreni, S. Moret and G. Rondinini (2000)** The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*. **31**, 2, 169-173.

- Martley F. G. and V. L. Crow (1993)** Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and reopening. *International Dairy Journal*. **3**, 4-6, 461-483.
- Masson F., G. Johansson and M. C. Montel (1999)** Tyramine production by a strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat-fat mixture. *Meat Science*. **52**, 1, 65-69.
- Masson F., R. Talon and M. C. Montel (1996)** Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*. **32**, 1-2, 199-207.
- Mathieu F., M. Michel and G. Lefebvre (1993)** Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnology Letters*. **6**, 585-590.
- McSweeney P. L. H., P. F. Fox, J. A. Lucey, K. N. Jordan and T. M. Cogan (1993)** Contribution of the indigenous microflora to the maturation of cheddar cheese. *International Dairy Journal*. **3**, 7, 613-634.
- Miguindou-Mabiala R. (1994)** Identification de *Carnobacterium* sp. dans les fromages par PCR. *DEA Procèdes Biotechnologiques et Alimentaires*. ENSAIA-INPL.
- Miller III A., M. E. Morgan and L. M. Librey (1974)** *Lactobacillus maltaromicus*, a new species producing a malty aroma. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **24**, 3, 346-354.
- Millière J. B. and G. Lefebvre (1994)** *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheeses from cow's raw milk. *Netherlands Milk & Dairy Journal*. **48**, 19-30.
- Millière J. B., M. Michel, F. Mathieu and G. Lefebvre (1994)** Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *Journal of Applied Bacteriology*. **76**, 264-269.
- Molimard P. and H. E. Spinnler (1996)** Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*. **79**, 169-184.
- Montel M. C., R. Talon, J. Fournaud and M. C. Champomier (1991)** A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**, 469-472.
- Mora D., M. Scarpellini, L. Franzetti, S. Colombo and A. Galli (2003)** Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**, Pt 3, 675-8.
- Morea M., F. Baruzzi and P. S. Cocconcelli (1999)** Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*. **87**, 4, 574-582.
- Morea M., A. Matarante, R. Di Cagno, F. Baruzzi and F. Minervini (2007)** Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. *International Dairy Journal*. **17**, 5, 525-534.

-N-

- Narvhus J. A., K. Osteraas, T. Mutukumira and R. K. Abrahamsen (1998)** Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*. **41**, 1, 73-80.
- Nilsson L., Y. Y. Ng, J. N. Christiansen, B. L. Jorgensen, D. Grotinum and L. Gram (2004)** The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*. **96**, 1, 133-143.

**Nissen H, Holck A and R. H. Dainty (1994 )** Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. *Letters in Applied Microbiology*. **19**, 3, 165-168.

**Nout M. J. R. (1994)** Fermented foods and food safety. *Food Research International*. **27**, 3, 291-298.

-O-

**Onal A. (2007)** A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. **103**, 4, 1475-1486.

-P-

**Parente E., M. Martuscelli, F. Gardini, S. Grieco, M. A. Crudele and G. Suzzi (2001)** Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*. **90**, 6, 882-91.

**Peterson. S. D. and R. T. Marshall. (1990)** Nonstarter *Lactobacilli* in Vheddar Cheese: A review. *Journal of Dairy Science*. **73**, 1395-1410.

**Piard J. C. and M. J. Desmazeaud (1992)** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. bacteriocins and other antimicrobial substances. *Le Lait*. **72**, 113-142.

**Piard J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud and T. R. Klaenhammer (1992)** Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied Environmental Microbiology*. **58**, 1, 279-284.

**Pikuta E. V., D. Marsic, A. Bej, J. Tang, P. Krader and R. B. Hoover (2005)** *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**, 1, 473-478.

**Preininger M. and W. Grosch (1994)** Evaluation of Key Odorants of the Neutral Volatiles of Emmentaler Cheese by the Calculation of Odour Activity Values. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. **27**, 3, 237-244.

-Q-

**Quadri L. E., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. de Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1997)** Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology*. **179**, 19, 6163-6171.

**Quadri L. E., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1994)** Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of biological chemistry*. **269**, 16, 12204-12211.

-R-

**Rachman C., P. Kabadjova, R. Valcheva, H. Prevost and X. Dousset (2004)** Identification of *Carnobacterium* Species by Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region and Species-Specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 8, 4468-4477.

**Richard C., A. Brillet, M. F. Pilet, H. Prevost and D. Drider (2003)** Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology*. **36**, 5, 288-292.

**Richard C., D. Drider, K. Elmorjani, D. Marion and H. Prevost (2004)** Heterologous Expression and Purification of Active Divercin V41, a Class IIa Bacteriocin Encoded by a Synthetic Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**, 13, 4276-4284.

**Rijnen L., M. Yvon, R. van Kranenburg, P. Courtin, A. Verheul, E. Chambellon and G. Smit (2003)** Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *International Dairy Journal*. **13**, 10, 805-812.

**Rogosa M., J. A. Mitchell and R. F. Wiseman (1951)** A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *Lactobacilli*. *Journal of Bacteriology*. **62**, 1, 132-133.

**Rychlik M. and J. O. Bosset (2001)** Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Evaluation of potent odorants. *International Dairy Journal*. **11**, 11-12, 895-901.

**Rynne N. M., T. P. Beresford, A. L. Kelly and T. P. Guinee (2007)** Effect of milk pasteurisation temperature on age-related changes in lactose metabolism, pH and the growth of non-starter lactic acid bacteria in half-fat Cheddar cheese. *Food Chemistry*. **100**, 1, 375-382.

-S-

**Sambrook J., Fritsch E. F. and T. Maniatis (1989)** Molecular cloning. *A laboratory manual*. New York.

**Santos M. H. S. (1996)** Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **29**, 2-3, 213-231.

**Scanlan R. A. (1983)** Formation and occurrence of nitrosamines in food. *Cancer research*. **43**, 5 Suppl, 2435s-2440s.

**Scarpellini M, Mora D, Colombo S and F. L. (2002)** Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains. *Current Microbiology*. **45**, 1, 24-29.

**Schillinger U, Stiles M.E. and W. H. Holzapfel (1993)** Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *International Journal of Food Microbiology*. **20**, 3, 131-147.

**Schleifer K. H., R. Plapp and O. Kandler (1968)** The amino acid sequence of the murein of *Microbacterium lacticum*. *Biochemistry Biophysics Acta*. **154**, 3, 573-582.

**Schobitz R., V. Suazo, M. Costa and L. Ciampi (2003)** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. **84**, 2, 237-244.

**Shalaby A. R. (1996)** Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. **29**, 7, 675-690.

**Skeie S. and Y. Ardo (2000)** Influence from Raw Milk Flora on Cheese Ripening Studied by Different Treatments of Milk to Model Cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. **33**, 7, 499-505.

**Smit B. A., W. J. M. Engels, J. T. M. Wouters and G. Smit (2004)** Diversity of l-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **64**, 3, 396-402.

**Smit G., B. A. Smit and W. J. Engels (2005)** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**, 3, 591-610.

**Sprules T., K. E. Kawulka, A. C. Gibbs, D. S. Wishart and J. C. Vederas (2004)** NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. *European Journal of Biochemistry*. **271**, 9, 1748-1756.

**Stackebrandt E., P. Schumann, J. Swiderski and N. Weiss (1999)** Reclassification of *Brevibacterium incertum* (Breed 1953) as *Desemzia incerta* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**, 1, 185-188.

**Stiles M. E. and W. H. Holzapfel (1997)** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. **36**, 1, 1-29.

**Stoffels G., I. F. Nes and A. Guthmundsdottir (1992a)** Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology*. **73**, 4, 309-316.

**Stoffels G., J. Nissen-Meyer, A. Gudmundsdottir, K. Sletten, H. Holo and I. F. Nes (1992b)** Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 5, 1417-1422

**-T-**

**Tahiri I., M. Desbiens, R. Benech, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet and I. Fliss (2004)** Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology*. **97**, 2, 123-136.

**Ten Brink B., C. Damink, H. M. L. J. Joosten and J. H. J. Huis in 't Veld (1990)** Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **11**, 1, 73-84.

**Thierry A., and M. B. Maillard (2002)** Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Le Lait*. **82**, 2002, 17-32.

**Thomas T. D. and G. G. Pritchard (1987)** Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Letters*. **46**, 3, 245-268.

**Tranchant C. C., D. G. Dalgleish and A. R. Hill (2001)** Different coagulation behaviour of bacteriologically acidified and renneted milk: the importance of fine-tuning acid production and rennet action. *International Dairy Journal*. **11**, 4-7, 483-494.

**-U-**

**Udenfriend S., Lovenberg W., and A. Sjoerdsma (1959)** Physiologically active amines in common fruits and vegetables. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **85**, 487-490.

**Urbach G. (1993)** Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*. **3**, 4-6, 389-422.

**-V-**

**Van Belkum M. J. and M. E. Stiles (2006)** Characterization of the theta-type plasmid pCD3.4 from *Carnobacterium divergens*, and modulation of its host range by RepA mutation. *Microbiology*. **152**, 1, 171-178.

**Vandenbergh P. A. (1993)** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**, 1-3, 221-237.

**-W-**

**Wallbanks S., A. J. Martinez-Murcia, J. L. Fryer, B. A. Phillips and M. D. Collins (1990)** 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **40**, 3, 224-30.

**Wasney M. A., R. A. Holley and D. S. Jayas (2001)** Cresol red thallium acetate sucrose inulin (CTSI) agar for the selective recovery of *Carnobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology*. **64**, 1-2, 167-74.

**Worobo R. W., Henkel T., Sailer M., Roy K. L., Vederas J.C., and M. E. Stiles (1994)** Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*. **140**, 3, 517-526.

**Worobo R. W., M. J. Van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles (1995)** A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology*. **177**, 11, 3143-3149.

-Y-

**Yamazaki K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue and T. J. Montville (2003)** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection*. **66**, 8, 1420-1425.

**Yamazaki K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue and T. J. Montville (2005)** Purification and Characterization of a Novel Class IIa Bacteriocin, Piscicocin CS526, from Surimi-Associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 1, 554-557.

**Yost C. K. and F. M. Nattress (2000)** The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Letters in Applied Microbiology*. **31**, 2, 129-133.

**Yvon M. and L. Rijnen (2001)** Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*. **11**, 4-7, 185-201.

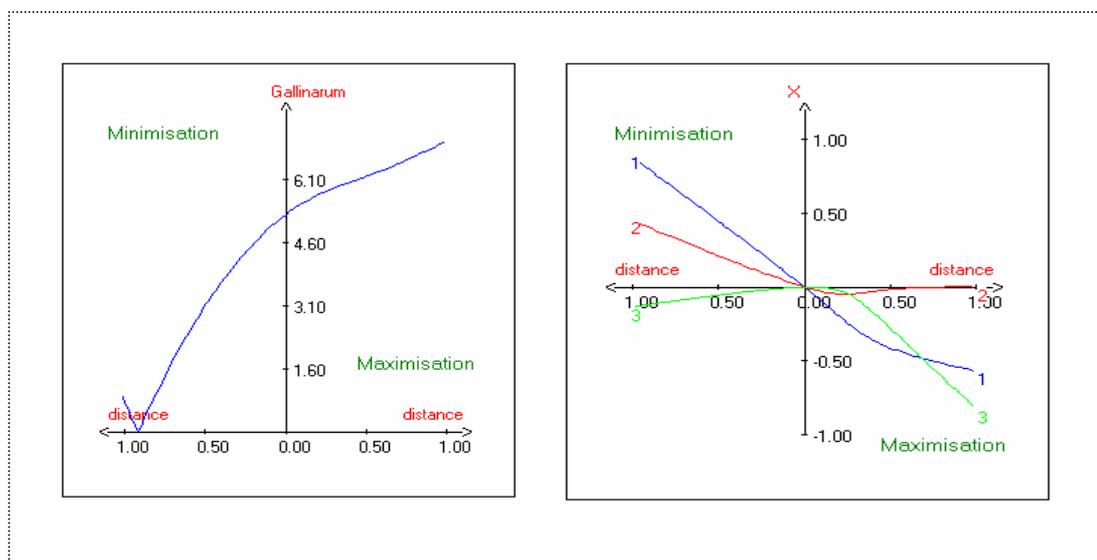


## **Annexes**

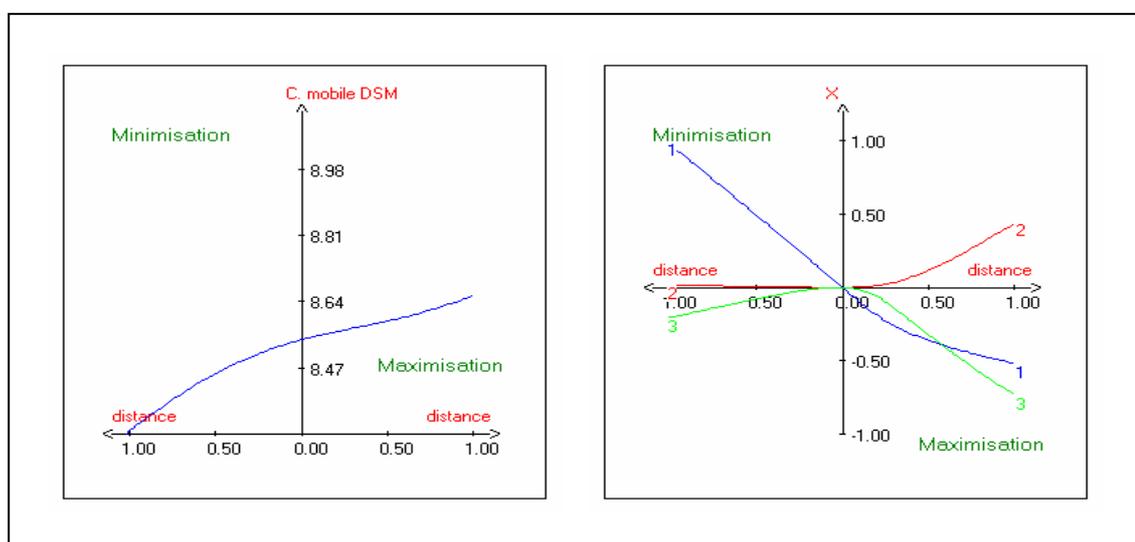


## Annexe 1

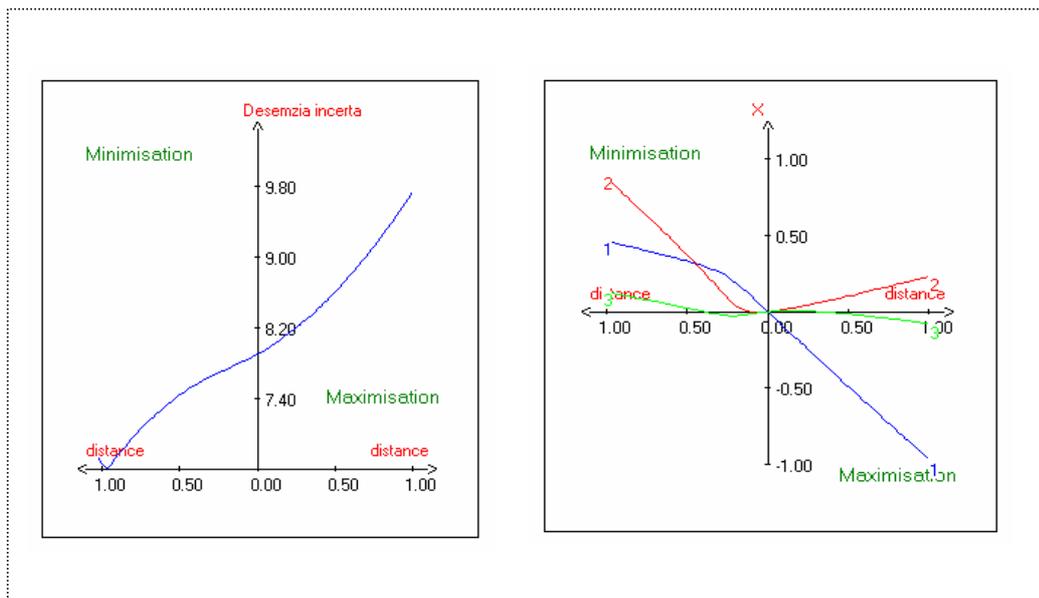
Chemins optima obtenus à partir d'un plan d'expériences (pH 8,80, vancomycine 2,5-4,5mg.L<sup>-1</sup>, gentamycine 2-8 mg.L<sup>-1</sup>, acide nalidixique 0-40 mg.L<sup>-1</sup>)



**Figure 1** : Chemin optimal pour la réponse de la souche de *C. gallinarum* CIP 105796  
1 : vancomycine ; 2 : gentamycine ; 3 : acide nalidixique ; *C. Carnobacterium*.



**Figure 2** : Chemin optimal pour la réponse de la souche de *C. mobile* DSM 4848<sup>T</sup>  
1 : vancomycine ; 2 : gentamycine ; 3 : acide nalidixique ; *C. Carnobacterium*.



**Figure 3** : Chemin optimal pour la réponse de la souche de *D. incerta* CIP 104227  
 1 : vancomycine ; 2 : gentamycine ; 3 : acide nalidixique ; *D. Desemzia*.

## Annexe 2

## Fabrication des « Petit sprêmes vitalités »

**Photo 1** : Ensemencement du lait de fabrication

Dans les bassines codées A, B et C, la population initiale en *C. maltaromaticum* LMA 28 souhaitée est de  $10^1$  ( $1 \log_{10}$ ),  $10^4$  ( $4 \log_{10}$ ) et  $10^7$  ( $7 \log_{10}$ ) ufc.mL<sup>-1</sup> de lait de fabrication. Pour l'essai A, 1 mL de levain *C. maltaromaticum* LMA 28 a été dilué au 1/100<sup>e</sup> et 0,26 mL de cette dilution a été introduit dans 260 mL de lait pasteurisé. Pour l'essai B, 2,6 mL de levain ont été ajoutés à 260 mL de lait. L'essai C correspond à l'ajout de 260 mL de levain. Le lait de la bassine 1 n'a pas étéensemencé en *C. maltaromaticum* LMA 28.

**Photo 2** : Tranchage du caillé

Le lait a été emprésuré par ajout de présure animale (CHR Hansen, le Moulon d'Aulnay, Arpajon, F) à 520 mg.L<sup>-1</sup> de chymosine, à raison de 7 mL pour 27 L de lait. Le temps de prise à 34 °C est de 9 min et le tranchage par découpage en cubes de 15 mm de côté est réalisé 45 min après l'emprésurage.

**Photo 3** : Moulage du caillé à l'aide d'un répartiteur

Après 30 min de repos sous sérum, le caillé est moulé dans 95 alvéoles.,

## Annexe 3

## Aspect des « Petit suprêmes vitalité » pendant le stockages



**Photo 1 :** Fromages présentant un feutrage mycélien recouvert de tâches brunes à orangé, après stockage de 32 jours à 12 °C.

**2 :** fromage obtenu avec du lait contenant une charge bactérienne initiale d'environ  $1. 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 (B) ; **3 :** fromage obtenu avec du lait contenant une charge bactérienne initiale d'environ  $1. 10^1$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28 (A).



**Photo 2 :** Fromages témoin après 32 jours de stockage à 4 °C.

**8 :** fromage témoin obtenu avec du lait nonensemencé avec *C. maltaromaticum* LMA 28



**Photo 6 :** Fromages de l'essai B après 32 jours d'affinage à + 4 °C.

fromage obtenu avec du lait contenant une charge bactérienne initiale d'environ  $1. 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> de *C. maltaromaticum* LMA 28

## Dégustation des « Petit suprême vitalité »

Date :

Nom :

<b>Code produit</b>					
<b>Date de fabrication</b>					
<b>ODEUR DU PRODUIT ENTIER</b> 10 %					
Champignon/moisi (O/N)					
Ammoniac (O/N)					
Styrène (O/N)					
Autre à définir					
<b>Note de 1 à 5</b>					
<b>ASPECT EXTERIEUR DE LA CROUTE</b> 20 %					
Fleur blanche (O/N)					
Surface couverte					
Arêtes et talons couverts (O/N)					
Poisseux (O/N)					
Traces de claires (O/N)					
<b>Note de 1 à 5</b>					
<b>ASPECT EXTERIEUR DE LA PATE</b> 10 %					
Cavernes					
Coulage					
<b>Note de 1 à 5</b>					
<b>TEXTURE EN BOUCHE DE LA CROUTE</b> 25 %					
Croûte trop épaisse (O/N)					
Croûte dure/ croquante (O/N)					
Croûte humide (O/N)					
Croûte sableuse (O/N)					
<b>Note de 1 à 5</b>					
<b>TEXTURE EN BOUCHE DE LA PATE</b> 10 %					
Molle (O/N)					
Collante (O/N)					
Caoutchouc (O/N)					
Farineux (O/N)					
Ferme (O/N)					
<b>Note de 1 à 5</b>					
<b>GOUT DU PRODUIT ENTIER</b> 25 %					
Beurre/crème (O/N)					
Vomi/rance (O/N)					
Ammoniac (O/N)					
Mois/champignon (O/N)					
Styrène (O/N)					
Autre à définir					
<b>SAVEURS</b>					
Salé (O/N)					
Acide (O/N)					
Amer (O/N)					
Piquant (O/N)					
<b>Note de 1 à 5</b>					
<b>Note globale</b>					

**Notation standard :** 5 = Excellent, très satisfaisant  
 4 = Bon dans la norme, satisfaisant  
 3 = léger défaut mais acceptable  
 2 = défaut grave apparent, médiocre  
 1 = défaut très marqué, inacceptable



## A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*

Hélène Carole Edima<sup>a</sup>, Catherine Cailliez-Grimal<sup>a,b,\*</sup>, Anne-Marie Revol-Junelles<sup>a</sup>, Loreto Tonti<sup>b</sup>,  
Michel Linder<sup>a</sup>, Jean-Bernard Millière<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Nancy-Université, Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA), Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires-Institut National Polytechnique de Lorraine (ENSAIA-INPL), 2, avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505, Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France

<sup>b</sup> Institut Universitaire de Technologie (IUT) Nancy-Brabois, Le Montet, 546001 Villers-lès-Nancy, France

Received 18 July 2006; received in revised form 17 October 2006; accepted 25 October 2006

Available online 4 December 2006

### Abstract

A selective medium was proposed for isolating the species *Carnobacterium maltaromaticum* from cheeses. This medium, named CM, was elaborated using combinations of three antibiotics (gentamicin, nalidixic acid, vancomycin) and alkaline pH value (8.8). An experimental design (Doehlert matrix) was drawn up to optimize the experimental conditions of the preparation of the medium. Based on the TS-YE agar medium, it contained 3.5 mg L<sup>-1</sup> of vancomycin, 5.0 mg L<sup>-1</sup> of gentamicin, and 20 mg L<sup>-1</sup> of nalidixic acid. The incubation time was 36 to 48 h at 25 °C. The selectivity of this medium was tested against bacterial strains present in the dairy industry and controlled by the PCR method. Thanks to this medium, it was easy to detect *C. maltaromaticum* and to follow this species in the cheese-making process.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Carnobacterium* sp.; Soft ripened cheese; Selective medium

### 1. Introduction

The genus *Carnobacterium*, proposed by Collins et al. (1987), contains nine species isolated from a variety of sources; it forms a group phylogenetically distinct from the other lactic acid bacteria (Wallbanks et al., 1990). Commonly associated with the spoilage of fish and meat products, *Carnobacterium* strains have been isolated from French flowered crust and soft cheeses (Millière and Lefebvre, 1994; Millière et al., 1994).

Present at various levels in raw milk, the selective enumeration of *Carnobacterium* sp. is necessary in order to monitor it during the manufacture of cheese. Some media are currently available for the semi-selective recovery of this genus. In this respect, the MRS, the Rogosa media as well as Cresol Red Thallium Acetate Sucrose (CTAS) agar (Baird et al., 1989) because of their acetate content and their low pH value (5.6 for

Rogosa medium) have been shown to lead to a low recovery of *Carnobacterium* (Holzapfel, 1992). In addition, the Cresol Red Thallium Acetate Sucrose Inulin agar (CTSI) has been used for the enumeration of four species of the *Carnobacterium* genus (*C. divergens*, *C. gallinarum*, *C. maltaromaticum*, and *C. mobile*). However it has a limited use due to its red colour, complexity and the long incubation time (2 days at 25 °C and 2 days at 8 °C) (Wasney et al., 2001).

Today there is no medium in which *Carnobacterium* sp. can be selectively enumerated in less than 48 h.

The aim of this study was therefore to propose a medium for a selective enumeration of *Carnobacterium* sp. in food matrices. The medium to be developed must associate the inhibiting properties of antibiotics and an alkaline pH value. In addition, colonies must be developed in less than 48 h without incubation at low temperature. Translucent and weakly coloured, it should also allow the easy and automated enumeration of colonies. Its composition should not be complex, in order to facilitate its realization and to reduce its cost. Such a medium must be appropriate for the enumeration of *Carnobacterium* sp. in a complex medium such as ripened soft cheese made from raw milk, by inhibiting the other flora. Therefore the selectivity of

\* Corresponding author. ENSAIA-INPL, Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 59 58 84; fax: +33 3 83 59 57 71.

E-mail address: [Catherine.Cailliez@ensaia.inpl-nancy.fr](mailto:Catherine.Cailliez@ensaia.inpl-nancy.fr) (C. Cailliez-Grimal).

the medium will be tested against strains present in the dairy environment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

Seventeen strains and one commercial lactic acid starter Flora Danica® (Lot 2506175, H491 CHR Hansen, le Moulin d'Aulnay, Arpajon, France) were purchased from the Collection de l'Institut Pasteur (CIP), the American Type Culture Collection (ATCC), the Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen (DSMZ) and the Laboratoire de Microbiologie Alimentaire de l'ENSAIA-INPL (LMA) (Table 1). Strains were maintained at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 15% (v/v) glycerol. The *Lactobacillus* strains were subcultured in MRS medium (AES Laboratoire, Combourg, France) and all other strains were subcultured in trypticase-soy medium (TS Biomerieux, Craponne, France) supplemented with 0.6% (w/v) yeast extract (YE, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and incubated at their optimal growth temperature.

### 2.2. Composition of the improved selective medium

The improved selective medium, coded CM (medium for *C. maltaromaticum* enumeration) was based on the TS-YE broth medium. The agar medium (TS-YE agar) is obtained by the addition of  $15\text{ g L}^{-1}$  of bacteriological standard agar (agar, Biokar Diagnostics) at pH 6.80. The pH values were increased by addition of 1 M NaOH (VWR International, Fontenay sous bois, France) after sterilization at  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The antibiotics gentamicin, vancomycin and nalidixic acid (Sigma-Aldrich, St. Quentin-Fallavier, France), sterilized by filtration

( $0.22\text{ }\mu\text{m}$ , Millipore, Cork, Ireland) were added to TS-YE agar after autoclaving.

### 2.3. Antibiotics susceptibility

Four target strains (*Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* LMA 28, *E. faecalis* CIP 76117, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>) were grown for 16 h at their optimal growth temperature in the TS-YE broth. After a 10-fold dilution in the Mueller-Hinton broth (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) to obtain  $10^7\text{ cfu mL}^{-1}$  (0.5 McFarland diluted 10 fold) or in the TS-YE broth at pH 8.8, 10 mL of inoculum were deposited on a 4 mm thick Mueller-Hinton agar plates (Biokar) or on TS-YE agar plates, pH 8.8 according to the CA-SFM method (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). The excess of inoculum was removed after 1 min of contact. Thirty different antibiotic disks (Biorad) were retained (Table 2). Disks, fifteen per plate, were deposited using a disk distributor (Biorad). After incubation at 30 or  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 18 h, diameters of inhibition zones were measured. The sensitivity testing was made according to the CA-SFM method.

### 2.4. Experimental design and statistics

A Doehlert experimental design was selected (Doehlert, 1970). The factors investigated were three antibiotics (vancomycin, gentamicin and nalidixic acid) at pH 8.80; the incubation time was 48 h at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  according to the preliminary studies (Table 3). The factorial growth (response) expressed as  $\text{Log}_{10}N$  can be predicted in all experimental regions according to the following equation

$$\text{Log}_{10}N = \beta_0 + \beta_1 V + \beta_2 G + \beta_3 \text{AN} + \beta_{11} V^2 + \beta_{22} G^2 + \beta_{33} \text{AN}^2 + \beta_{12} \text{VG} + \beta_{13} \text{VAN} + \beta_{23} \text{GAN}$$

where  $\beta_0$  is the constant term,  $\beta_1$  determines the influence of vancomycin;  $\beta_2$  the influence of gentamicin;  $\beta_3$  the influence of nalidixic acid;  $\beta_{12}$  the interaction effect between vancomycin and gentamicin;  $\beta_{13}$  the interaction effect between vancomycin and nalidixic acid;  $\beta_{23}$  the interaction effect between gentamicin and nalidixic acid and  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{33}$ , “shape” parameters. Data analysis, ANOVA, and polynomial regressions were performed using the NEMROD® software (LPRAI, Marseille, France; Mathieu and Phan-Tan-Luu, 1997).

### 2.5. Recovery of *C. maltaromaticum* on selective medium

The recovery of *C. maltaromaticum* LMA 28 on CM medium was compared to that on TS-YE agar at pH 6.80 and pH 8.80. Bacterial culture was pre-incubated overnight in TS-YE broth at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Decimal dilutions of the cultures, made in 9 mL of tryptone salt (0.9%), were plated on agar medium using a spiral plating (Whitley Automatic Spiral Plater, WASP 2, AES Laboratoire). Plates were incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Ten replicates were done for each experiment.

The recovery of *C. maltaromaticum* was realized against a control with a mixture of four strains, *E. coli* CIP 54.8, *E. faecalis*

Table 1  
Strains used in this study

Bacterial species	Strain codes	Incubation ( $^{\circ}\text{C}$ )
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	DSM 20171 <sup>T</sup>	30
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	CIP 105796	20
<i>C. divergens</i>	DSM 20624 <sup>T</sup>	30
<i>C. funditum</i>	CIP106503	22
<i>C. gallinarum</i>	DSM 4847 <sup>T</sup>	30
<i>C. inhibens</i>	CIP 106863	37
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM 20730 <sup>T</sup> ; LMA 28; LMA 29	30
<i>C. mobile</i>	DSM 4848 <sup>T</sup>	30
<i>C. viridans</i>	CIP 107728	25
<i>Desemzia incerta</i>	CIP 104227	30
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 76117	30
<i>Escherichia coli</i>	CIP 54.8	37
Flora Danica®	Lot 2506175	30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174 <sup>T</sup>	30
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 82110 <sup>T</sup>	37
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CIP 6913	30

<sup>T</sup>; Standard stock characterizing the bacterial species, ATCC, (American Type Culture Collection Rockville, U.S.A), CIP; (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France), DSM; (Deutsche Sammlung von Micro-Organismen und Zellkulturen, Göttingen, Allemagne), LMA; (Laboratoire de Microbiologie Alimentaire; ENSAIA-INPL, Nancy, France).

Table 2  
Differences of antibiotic inhibition zone diameters (mm) on TS-YE agar at pH 8.8 and on Mueller-Hinton agar

Antibiotic	Strains			
Disks ( $\mu\text{g}$ )	<i>B. thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup>	<i>C. maltaromaticum</i> LMA 28	<i>E. faecalis</i> CIP 76117	<i>L. monocytogenes</i> CIP 82110 <sup>T</sup>
Amoxicillin (25)	N <sup>a</sup> (S)	+25±1.0 (S; R <sup>b</sup> )	0 (S; S)	-10±1.0 (S; S)
Ticarcillin (75)	N (S)	+5±0.3 (R; R)	-3±0.3 (R; I)	0 (S; S)
Cefalotin (30)	N (S)	+3±0.3 (I; R)	-3±0.3 (R; R)	0 (S; S)
Cefoxitin (30) <sup>o</sup>	N (R)	+2±0.3 (R; R)	0 (R; R)	0 (S; S)
Cefotaxim (30)	N (R)	+4±0.3 (R; R)	0 (R; R)	+17±1.0 (S; R)
Amoxicillin-clavulanic acid (20/10)	N (S)	0 (S; S)	-9±1.0 (S; S)	0 (S; S)
Ceftazidim (30)	N (R)	0 (R; R)	0 (R; R)	0 (R; R)
Cefixim (10)	N (R)	0 (R; R)	0 (R; R)	0 (R; R)
Penicillin (6)	N (S)	+9±0.5 (S; R)	-5±0.5 (S; S)	+10±0.5 (S; S)
Cefoperazon (30)	N (I)	+2±0.3 (R; R)	-4±0.5 (R; R)	-6±0.5 (R; I)
Trimethoprim-sulfamid (1.25/23.75)	N (S)	0 (S; S)	0 (S; S)	0 (S; S)
Trimethoprim (5)	N (S)	0 (S; S)	0 (S; S)	0 (S; S)
Sulfamid (200)	N (S)	0 (R; R)	0 (R; R)	0 (R; R)
Nalidixic acid (30)	N (R)	0 (R; R)	0 (R; R)	0 (R; R)
Ciprofloxacin (5)	N (S)	+7±0.5 (S; R)	0 (R; R)	0 (I; I)
Pefloxacin (5)	N (S)	0 (I; I)	0 (R; R)	0 (R; R)
Chloramphenicol (30)	N (S)	0 (S; S)	0 (I; I)	+10±0.5 (S; I)
Tetracycline (30)	N (S)	-16±1.0 (R; S)	+15±0.5 (S; S)	-10±0.5 (S; S)
Erythromycin (15)	N (S)	0 (S; S)	+10±0.5 (S; S)	0 (S; S)
Lincomycin (15)	N (R)	+10±1.0 (I; R)	+20±0.5 (S; R)	+15±0.5 (S; R)
Pristinamycin (15)	N (S)	0 (S; S)	+5±0.5 (S; I)	0 (S; S)
Amikacin (30)	N (S)	0 (R; R)	0 (R; R)	0 (S; S)
Netilmicin (30)	N (S)	0 (I; I)	+10±0.5 (S; R)	+5±0.5 (S; S)
Kanamycin (30)	N (S)	-4±0.3 (R; R)	+6±0.5 (I; R)	0 (S; S)
Gentamicin (15)	N (S)	0 (R; R)	+12±0.5 (S; R)	0 (S; S)
Tobramycin (10)	N (S)	-6±0.5 (R; R)	0 (R; R)	0 (R; R)
Bacitracin (130)	N (S)	0 (S; S)	0 (S; S)	0 (S; S)
Fosfomicin (50)	N (S)	-2±0.3 (R; R)	-10±0.5 (R; S)	0 (R; R)
Vancomycin (30)	N (S)	-4±0.3 (R; S)	+4±0.5 (S; R)	0 (S; S)
Teicoplanin (30)	N (S)	+2±0.3 (S; S)	+5±0.5 (S; S)	0 (S; S)

Mean±standard error.

+: Increased diameter on TS-YE at pH 8.8 compared with Mueller-Hinton.

-: Lower diameter on TS-YE at pH 8.8 compared with Mueller-Hinton.

<sup>a</sup> N: not measurable at pH 8.8.

<sup>b</sup> First letter was the response on TS-YE agar at pH 8.8, second letter on Mueller-Hinton. Sensitivity testing used the diffusion method according to the recommendations of CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), R: resistant; S: sensitive, I: intermediary.

CIP 76117, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, *Pseudomonas fluorescens* CIP 6913, and Flora Danica<sup>®</sup>. A volume of 1 ml of each bacterial culture in TS-YE broth was introduced into a test tube. Initial cellular enumeration of each culture was made. One ml of a suspension mother of *C. maltaromaticum* LMA 28 was added to the mixture of strains. Bacterial dilutions were plated on TS-YE agar pH 6.80 or pH 8.80 and on CM agar medium using spiral plating. Incubations were carried out at 25 °C for 48 h. Experiments were performed in triplicate.

## 2.6. Follow-up of *Carnobacterium* in cheese

White mould soft cheese models (camembert type) were manufactured using a laboratory scale cheese production. Cheese trials were made from 120 L of pasteurised (77 °C, 20 s) milk, standardized at 33 g L<sup>-1</sup> of fat. Batches were inoculated with 15 g of the *Lactococcus lactis* R 603 (CHR Hansen). Flora Danica<sup>®</sup> was inoculated at level of 1% (v/v). *Penicillium camemberti* Aura 12 and *Geotrichum candidum* GCM 33 were also added to milk at the time of starter addition. For the maturation period, milk was stored at 10 °C for 16 h and then warmed to 34 °C for the cheese-

making process. Milk was separated into four cheese vats of 27 L each. The reference cheese (R) only contained the lactic acid bacteria strains. The three others vats A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> were inoculated with *C. maltaromaticum* LMA 28 milk culture (30 °C–24 h) at initial population of about 1.10<sup>1</sup> cfu mL<sup>-1</sup>, 1.10<sup>4</sup> cfu mL<sup>-1</sup> and 1.10<sup>7</sup> cfu mL<sup>-1</sup>, respectively. After 20 min, rennet (CHR Hansen), containing 520 mg L<sup>-1</sup> chymosine (7 mL in 27 L of milk) was added. Coagulation took place after 9 min and the coagulum was ready to be moulded 45 min after renning. The curd was cut into 15 mm cubes, allowed to settle for 30 min and transferred into moulds. Cheeses were salted by brining in a 28% (w/v) NaCl solution for 30 min at 20 °C. Ripening took place for 10 days at 10 °C and the cheeses were stored at 4 °C for 10 days. During the ripening phase cheese samples were analysed for bacterial enumeration (Table 4). So, fractions of whole cheese (10 g interior and surface) were homogenised in 90 mL citrate buffer (0.5 M, pH 7.0) with a stomacher mixer (Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France) for 3 min. The whole suspension was submitted to a serial decimal dilution in tryptone salt solution (0.95% w/v; Oxoid). Each dilution was plated on TS-YE agar at pH 6.80 and CM agar using the spiral plating.

Table 3

Experimental design established according to the Doehlert's matrix with three factors (vancomycin, gentamicin, nalidixic acid)

Number of tests	Vancomycin 5 levels (mg L <sup>-1</sup> )	Gentamicin 7 levels(mg L <sup>-1</sup> )	Nalidixic acid 3 levels (mg L <sup>-1</sup> )
1	4.5	5.0	20
2	2.5	5.0	20
3	4.0	8.0	20
4	3.0	2.0	20
5	4.0	2.0	20
6	3.0	8.0	20
7	4.0	6.0	40
8	3.0	4.0	0
9	4.0	4.0	0
10	3.5	7.0	0
11	3.0	6.0	40
12	3.5	3.0	40
13	3.5	5.0	20
14	3.5	5.0	20
15	3.5	5.0	20
16	3.5	5.0	20

Vancomycin: 5 levels, between 2.5 and 4.5 mg L<sup>-1</sup> (increment of 0.5), gentamicin: 7 levels, between 2.0 and 8.0 g L<sup>-1</sup> (increment of 1.0), nalidixic acid: 3 levels, between 0 and 40 mg L<sup>-1</sup> (increment of 20).

## 2.7. Polymerase chain reaction amplification of *C. maltaromaticum* DNA sequences

### 2.7.1. Oligonucleotide primers

DNA sequences of the primers, obtained from Eurogentec (Herstal, Belgium) were 23S-7 (5'-ggg act tag atg ttt cag ttc-3') and Cpis (5'-ttt att ttt aat taa ata ccc-3') (Rachman et al., 2004).

### 2.7.2. Nucleic acid extraction

Template DNA was obtained by the boiling method (De Medici et al., 2003, Yost and Nattress, 2000). In this method,

bacterial colony was picked from CM agar plates with a sterile toothpick and re-suspended in 50 µL of sterile ultrapure water (Easypure, RF, Fischer Bioblock, Illkirch, France). The resulting suspension was boiled for 5 min, centrifuged for 3 min at 8000 ×g. The supernatant (10 µL) was used for PCR reaction.

### 2.7.3. Polymerase chain reaction amplification

PCR amplification was performed on a PHC-3 thermal cycler (Techne, Cambridge, UK). The thermal program for amplification was 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s with a final step for 7 min. Following amplification, 20 µL of product was electrophoresed on a 1.5% agarose gel containing 5 µg.mL<sup>-1</sup> of ethidium bromide.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Preliminary experiments

On TS-YE agar at different pH values (5 to 9), the enumeration of *C. maltaromaticum* LMA 28 did not vary significantly, after 48 h of incubation at 25 or 30 °C (data not shown). The pH value of 8.8 was shown to inhibit the growth of the majority of lactic acid bacteria and was retained for further experiments.

The antibiotic susceptibilities of *C. maltaromaticum* LMA 28, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> and *E. faecalis* CIP 76 117 (physiologically and phenotypically closely related genera) were tested on the Mueller-Hinton reference medium and on TS-YE agar at pH 8.8 (test medium) to determine whether they exhibited any differences in profiles. Results on the antibiotic inhibition zone diameters (mm) are shown in Table 2. Susceptibility to β-lactams depended on the pH value. For amoxicillin and cefalotin, *C. maltaromaticum*

Table 4

Coefficient estimations of the different quadratic models for the three variables vancomycin, gentamicin, nalidixic acid of the Doehlert's matrix

		Bacterial strains						
		<i>C. gallinarum</i>	<i>C. maltaromaticum</i>		<i>C. mobile</i>	<i>D. incerta</i>	<i>E. faecalis</i>	
		DSM 4847 <sup>T</sup>	DSM 20730 <sup>T</sup>	LMA 28	LMA 29	DSM 4848 <sup>T</sup>	CIP 104227	CIP 76117
Factors	Log <sub>10</sub> N <sub>0</sub>	9.0	9.2	8.9	9.3	8.9	9.4	9.4
Terms								
Log <sub>10</sub> N	β0	5.2602***	8.740***	8.925***	9.112***	8.542***	7.898***	4.080***
V	β1	-2.695***	-1.149***	-0.164***	-0.531***	-0.119***	-0.975***	-2.063***
G	β2	-0.986	-0.054	-0.021	-0.056	0.001	0.091	-0.065
NA	β3	0.078	-0.006	0.008	0.014	-0.004	0.092	-0.104
V <sup>2</sup>	β11	-2.185*	-0.840***	-0.220	-0.387***	-0.108**	-0.737*	-1.100**
G <sup>2</sup>	β22	-0.675	0.227	0.110	-0.017	0.059	-0.956	-0.607
NA <sup>2</sup>	β33	0.670	0.211	0.075	0.020	0.038	0.016**	-0.496
V/G	β12	-2.650	-0.023	-0.064	-0.040	-0.012	-0.958*	-0.058
V/NA	β13	1.151	0.027	0.010	0.125	0.096	0.180	-0.384
G/NA	β23	0.629	0.119	0.173	-0.032	-0.015	-0.563	-1.268*

The response was represented by the polynomial equation:

$$\text{Log}_{10}N = \beta_0 + \beta_1 V + \beta_2 G + \beta_3 \text{AN} + \beta_{11} V^2 + \beta_{22} G^2 + \beta_{33} \text{AN}^2 + \beta_{12} \text{VG} + \beta_{13} \text{VAN} + \beta_{23} \text{GAN}$$

Vancomycin (V), gentamicin (G), nalidixic acid (NA).

Coefficient significance: \*\*\* ≤ 1%; 1% <, \*\* ≤ 1%; 1% <, \* ≤ 5%.

LMA 28 was more susceptible on TS-YE agar at pH 8.8 than on Mueller-Hinton. Because of this,  $\beta$ -lactams were discarded.

In the same vein, the sulfamid and trimethoprim, macrolid (erythromycin), lincosamid (lincomycin) streptogramins (pristinamycin), bacitracin and fosfomicin were not retained because they induced no significant difference between the strains tested.

Among the aminoside antibiotics family, netilmicin, kanamycin and gentamicin were interesting because of the susceptibility of *E. faecalis* CIP 76 117 at pH 8.8. Similar observations were made with the glycopeptide vancomycin and the cyclin tetracycline. In the meantime, *C. maltaromaticum* LMA 28 was resistant to these antibiotics. Among these five antibiotics, gentamicin and vancomycin were retained, while nalidixic acid was used for the susceptibility of Gram negative bacteria.

### 3.2. Doehlert experiment design

In order to find appropriate concentrations of antibiotics, an experimental tool using the Doehlert matrix (Doehlert, 1970) was used with a narrow range of concentrations which could permit a good growth of *C. maltaromaticum* (Table 3). The mathematical tool was chosen to replace the traditional kinetic experiments in order to study the interactions between factors and to obtain the maximum information and precision from a reduced number of experiments.

Based on their response, the bacteria were divided into 2 groups.

In the first group, comprising ten strains and the commercial starter, the constant factor  $\beta_0$  ( $\text{Log}_{10}N$ ) was  $<1$ . The commercial starter Flora Danica<sup>®</sup>, *Lactobacillus plantarum* DSM 20174<sup>T</sup> and *P. fluorescens* CIP 6913 were inhibited by the high pH value (8.8); *E. coli* CIP 54.8 was naturally sensitive to nalidixic acid. *Carnobacterium funditum* CIP 106503 did not grow under our experimental conditions because its growth requires 72 h of incubation. For *C. alterfunditum*, *C. divergens*, *C. inhibens* and *C. viridans*, a very weak growth was observed. The CM medium strongly inhibited the growth of spoilage or pathogenic strains, such as *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> and *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>.

In the second group, for seven strains, bacterial enumerations ( $\text{Log}_{10}N$ ) were carried out using Nemrod software. The constants derived from the polynomial model are reported in Table 4. The result showed that the growth of *E. faecalis* CIP 76 117 and *C. gallinarum* DSM 4847<sup>T</sup> were reduced by approx-

imately 4–5  $\text{Log}_{10}$  ( $\beta_0$  4.08 and 5.2). For *C. maltaromaticum* (LMA 28, DSM 20730<sup>T</sup> and LMA 29), *C. mobile* DSM 20730<sup>T</sup> and *Desemzia incerta* strains, the constant term  $\beta_0$  was significantly higher than the initial inoculum ( $\text{Log}_{10}N_0$ ) and indicated the absence of growth inhibition. Vancomycin was the most inhibiting factor, while nalidixic acid has no inhibiting effect on the Gram-positive strains, which are known to be naturally resistant to it. In this case, interaction factors obtained in the study were not significant.

The results of this experimental design allowed elaboration of a selective medium for the enumeration of *C. maltaromaticum* along with *D. incerta* and *C. mobile*. This medium was then optimized using an optimal graph analysis with values of the coded factor axis at 1.00 and the optimal concentrations adjusted. The centre of the field comprising 3.5  $\text{mg L}^{-1}$  of vancomycin, 5.0  $\text{mg L}^{-1}$  of gentamicin, 20  $\text{mg L}^{-1}$  of nalidixic acid, was used as the selective culture CM medium for *C. maltaromaticum*. Incubation time was 36 to 48 h at 25 °C. As the factor values decrease, a nonsignificant increase of *Carnobacterium* population levels (8.9 to 9.1  $\text{Log}_{10}$ ) was observed while the enumeration of *E. faecalis* increased. For initial bacterial populations of  $10^9$  cfu  $\text{mL}^{-1}$ , these conditions involved a reduction of approximately 5  $\text{Log}_{10}$  of the population of *E. faecalis* and a strong inhibition of *L. monocytogenes*.

### 3.3. Recovery of *C. maltaromaticum* on the selective CM medium

The selective CM medium was compared with the reference medium TS-YE agar at pH 6.8 or 8.8, with *C. maltaromaticum* LMA 28. Repeatability tests did not show significant differences on the enumeration of the three media with an average value of  $9.34 \pm 0.05$  ( $\text{Log}_{10}N$ ) suggesting that this medium has a good recovery for *C. maltaromaticum* LMA 28.

CM medium, inoculated with a mixture of four microorganisms (*E. coli* CIP 54.8, *E. faecalis* CIP 76117, *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, *P. fluorescens* CIP 6913) and Flora Danica<sup>®</sup>, at  $10^9$  cfu  $\text{mL}^{-1}$  each, without *C. maltaromaticum* LMA 28 did not allow the growth of any colony at dilution  $-5$  and  $-6$ . Similar experiments carried out with *C. maltaromaticum* LMA 28 added to the mixture of microorganisms at the same level, resulted in 100% recovery of *C. maltaromaticum* LMA 28 with subsequent inhibition of the other strains tested. The results suggest that this medium can successfully be used for the enumeration of *C. maltaromaticum* in a bacterial environment.

Table 5  
Behavior of *C. maltaromaticum* LMA 28 during cheese ripening at 10 °C and cold storage at 4 °C

Incubation temperature ( °C)	Ripening time (day)	Total flora $\text{Log}_{10}$ (cfu $\text{g}^{-1}$ ) <sup>a</sup> (SE $\leq 0.06$ ) on TS-YE agar, pH 6.8	Enumeration of <i>C. maltaromaticum</i> LMA 28 $\text{Log}_{10}$ (cfu $\text{g}^{-1}$ ) <sup>a</sup> (SE=0.06) on CM medium			
			Control R	A <sub>1</sub> : 1.10 <sup>1</sup>	A <sub>2</sub> : 1.10 <sup>4</sup>	A <sub>3</sub> : 1.10 <sup>7</sup>
10	0	8.38	<2	2.76	4.00	7.73
10	1	9.10	<2	2.63	4.72	7.25
10	6	9.08	<2	3.20	5.85	8.12
10	10	9.51	<2	3.86	7.19	8.20
4	20	8.17	<2	5.88	6.94	6.76
4	27	7.84	<2	7.96	8.25	8.23

<sup>a</sup> Results as expressed as the mean of three independent determinations with the standard error (SE).

### 3.4. Follow-up of *C. maltaromaticum* LMA 28 during ripening and storage

*C. maltaromaticum* LMA 28 was inoculated at  $10^1$ ,  $10^4$  or  $10^7$  cfu mL<sup>-1</sup> in milk, and followed up during the ripening of cheeses after ten days at 10 °C and after seventeen days storage at 4 °C. At the end of the ripening period, results showed that counts depended on the initial inoculum, while these values were near  $10^8$  cfu g<sup>-1</sup> of cheese at the end of the cold storage, (Table 5). All the colonies recovered on the CM medium were shown to belong to *C. maltaromaticum* as confirmed by the PCR test with one band of 650 pb obtained (data not shown). This suggests that a combination of low acidity and low temperature increases the growth of *C. maltaromaticum* LMA 28, a strain known to be non-aciduric and psychrotrophic.

In conclusion, the CM medium is highly specific to *C. maltaromaticum*. Its preparation is easy and as translucent as TS-YE agar, and it allows an automated enumeration of bacterial colonies. Its composition is simpler than CTSI medium and the *C. maltaromaticum* strains are obtained in less than 36 to 48 h at only one temperature 25 °C without incubation at low temperature. This short incubation time avoids the growth of fungi. This medium is able to inhibit all natural bacteria flora in cheeses, and also *L. monocytogenes* and *E. faecalis*. In this respect it could be used as a broth medium for the enrichment of the *C. maltaromaticum* species.

### References

- Baird, R.M., Corry, J.E.L., Curtis, G.W., Mossel, D.A., Skovgaard, N., 1989. Pharmacopoeia of culture media for food microbiology: additional monographs. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 85–144.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S., 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. Syst. Bacteriol.* 37 (04), 310–316.
- De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L., 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella* enterica serotype enteritidis in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), 3456–3461. Online. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12788750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12788750).
- Holzappel, W.H., 1992. Culture media for non-sporulating gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 17 (2), 113–133. Online. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1486021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1486021).
- Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R., 1997. Nemrod®: New Efficient Methodology for Research Using Optical Design. LPRAI Université d'Aix-Marseille.
- Millière, J.B., Lefebvre, G., 1994. *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheeses from cow's raw milk. *Neth. Milk Dairy J.* 48, 19–30.
- Millière, J.B., Michel, M., Mathieu, F., Lefebvre, G., 1994. Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 264–269.
- Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prevost, H., Dousset, X., 2004. Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8), 4468–4477. Online. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15294774](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15294774).
- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (3), 224–230. Online. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1697764](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1697764).
- Wasney, M.A., Holley, R.A., Jayas, D.S., 2001. Cresol red thallium acetate sucrose inulin (CTSI) agar for the selective recovery of *Carnobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 64 (1–2), 167–174. Online. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11252499](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11252499).
- Yost, C.K., Nattress, F.M., 2000. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (2), 129–133. Online. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10972714](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10972714).

## Short Communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: The Only *Carnobacterium* Species in French Ripened Soft Cheeses as Revealed by Polymerase Chain Reaction Detection

C. Cailliez-Grimal,\*†<sup>1</sup> H. C. Edima,\* A.-M. Revol-Junelles,\* and J.-B. Millière\*†

\*Nancy-Université, Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA), Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires-Institut National Polytechnique de Lorraine (ENSAIA-INPL), 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France  
†Institut Universitaire de Technologie (IUT) Nancy-Brabois, Le Montet, F-54600 Villers-lès-Nancy, France

### ABSTRACT

The PCR technique using Cb1-Cb2R and species-specific primers was applied to various French soft flowered or washed rind cheeses to identify *Carnobacterium* species. Thirty cheeses made from cow's, ewe's, or goat's milk (raw or pasteurized), of which 20 were Appellation d'Origine Contrôlée, were analyzed in the autumn and spring. The results revealed that, irrespective of the season, the *Carnobacterium* genus was initially detected in 5 cheeses and was detected in 5 others after an enrichment period. Polymerase chain reaction results using species-specific primers of *Carnobacterium* showed that these 10 cheeses contained only the species *Carnobacterium maltaromaticum*. Six different patterns of fermentation were found, and 3 of the 10 cheeses contained *C. maltaromaticum* isolates with anti-*Listeria* activity.

**Key words:** *Carnobacterium*, polymerase chain reaction, French soft cheese

In the manufacture of soft cheeses, lactic acid bacteria are involved in all phases of cheese making. Initially present as natural microbiota or added as starter cultures, they actively participate in the development of flavor and texture in a wide range of cheeses (Giraffa, 2004; Marilley and Casey, 2004). *Carnobacterium* is a lactic acid bacterium that is not used as a starter because of its nonaciduric and psychrotrophic properties. Indeed, it cannot participate actively in the first phase of fermentation, but its growth can be induced during ripening as pH values increase and after a cold-storage period. Studies have shown that the *Carnobacterium* genus is predominant in French surface-mold-ripened soft Brie cheeses (Millière et al., 1994; Millière and Leblond, 1994). This genus has frequently been associ-

ated with the spoilage of seafood and meat products (Pilet et al., 1994; Connil et al., 1998; Paludan-Muller et al., 1998; Dalgaard et al., 2003). However, the bacteriocin-production ability of *Carnobacterium* genus may be considered useful in preventing the growth of foodborne pathogens such as *Listeria* (Duffes et al., 1999; Brillet et al., 2005; Laursen et al., 2005).

The aim of this work was to determine whether *Carnobacterium* is a ubiquitous genus present in many traditional soft cheeses and whether a diversity of species exists. Samples were taken from cheeses manufactured from cow's, goat's, and ewe's milk (raw or pasteurized) in different French provinces during 2 periods of the year. A previous study showed that genus-specific primers could be applied for the detection of this genus in cheeses (Cailliez-Grimal et al., 2005). Species-specific primers (Rachman et al., 2004) were then tested and applied to the cheese samples.

Strains were purchased from different collections (Table 1) and were maintained at -20°C in 15% (vol/vol) glycerol. They were subcultured in trypticase-soy medium (TS; Biomerieux, Crajonne, France) supplemented with 0.6% (wt/vol) yeast extract (YE; Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and incubated at their optimal growth temperature (Table 1).

Thirty cheeses, manufactured in France and purchased from a local supermarket in October 2004 and April 2005 (Table 2), were analyzed and their *Carnobacterium* flora enumerated by plate count and by PCR (see below). Fractions (10 g) of whole cheese (surface and interior) were homogenized in 90 mL of citrate buffer (0.5 M, pH 7.0). The whole suspension was submitted to a serial decimal dilution. Improvements in the detection of *Carnobacterium* spp. from cheese can be obtained on nonselective media (TS-YE agar or broth) with high pH values (pH 9; Holzappel, 1992) supplemented with 40 mg/L of nalidixic acid (Sigma, St. Louis, MO) and 5 mg/L of amphotericin (Sigma) and incubated under psychrotrophic conditions (at 7°C for 10 d). For the plate count method, each serial decimal dilution was plated using spiral plating (Whitley Auto-

Received February 22, 2006.

Accepted October 21, 2006.

Corresponding author: catherine.cailliez@ensaia.inpl-nancy.fr

Table 1. Strains used in this study<sup>1</sup>

Bacterial species	Strain designation	Growth temperature, °C
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	CIP 105796	20
<i>Carnobacterium divergens</i>	DSM 20624 <sup>T</sup>	30
<i>Carnobacterium funditum</i>	CIP106503	22
<i>Carnobacterium gallinarum</i>	DSM 4847 <sup>T</sup>	30
<i>Carnobacterium inihbens</i>	CIP 106863	37
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	DSM 20730 <sup>T</sup>	30
<i>C. maltaromaticum</i>	LMA 28	30
<i>Carnobacterium mobile</i>	DSM 4848 <sup>T</sup>	30
<i>Carnobacterium viridans</i>	CIP 107728	25

<sup>1</sup>CIP = Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France); DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany); LMA = Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, ENSAIA-INPL (Nancy, France); <sup>T</sup> = type strain.

matic Spiral Plater, WASP 2; AES Laboratoire, Bruz, France). For the enrichment method, 10 g of each cheese was mixed with 90 mL of TS-YE broth medium (described above). The interior pH of the cheese was measured with an electrode pHM210 standard pH meter (Radiometer Analytical, Villerbanne, France).

Five colonies from each cheese sample were collected randomly. Isolates were Gram stained and examined for cell morphology and catalase activity. The carbohydrate fermentation patterns were identified with API 50 CHL galleries (API System, Montalieu-Vercieu, France).

Template DNA was obtained by the boiling method (Yost and Nattress, 2000; De Medici et al., 2003). One isolated bacterial colony was picked from the modified TS-YE agar plates with a sterile toothpick and resuspended in 50 µL of sterile ultrapure water (Easypure, RF; Fisher Bioblock, Illkirch, France). From the TS-YE broth culture, a volume of 50 µL was centrifuged in a microcentrifuge at 8,000 × g for 3 min and the cell pellet was resuspended in 100 µL of sterile ultrapure water. These suspensions were boiled for 5 min, and the cellular debris was then pelleted by centrifugation at 8,000 × g for 3 min. Ten microliters of each supernatant was retained for the PCR reaction.

Fractions of whole cheese (10 g) were homogenized as described above. A 1,000-fold-diluted matrix was used for the PCR assay. For the enrichment method, 10 g of each cheese was mixed with 90 mL of enrichment medium, as described above. After 10 d at 7°C, a 1,000-fold-diluted sample was used for PCR.

Deoxyribonucleic acid sequences of the primers (obtained from Eurogentec, Herstal, Belgium) are indicated in Table 3. The amplification was carried out in a thermal cycler iCycler System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The reaction mixture (50 µL) contained 25 µL of the ready-to-use master mixes (Eurogentec) and 10 µL of the sample (described below), completed to 50 µL with sterile ultrapure water. The PCR

program was as follows: 5 min at 95°C for primary DNA denaturation, followed by a series of 30 cycles, each of which comprised 30 s at 95°C (denaturation), 30 s at the corresponding annealing temperature (see Table 3), 30 s at 72°C (extension), and a 7-min final extension step at 72°C. Products were stored at 4°C until analysis. Aliquots (20 µL) of the amplified products were subjected to electrophoresis in 1.5% (wt/vol) agarose gels (Agarose DNA grade; Euromedex, Souffelweyersheim, France) in TAE buffer (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.2). Gels were stained with ethidium bromide (5 µg/mL) and visualized under UV light (312 nm). A 100-bp DNA ladder polymer was used as a molecular mass marker (Eurogentec).

To test the production of antimicrobial compounds, 50 µL of neutralized and pasteurized cell-free culture supernatant fluid of each isolate was tested for the ability to produce antagonistic substances against *Listeria monocytogenes* CIP 82110 by the agar well-diffusion method (Mayr-Hasting et al., 1972).

Among the 30 cheeses tested, only DNA extracted from 5 cheeses (Brique de Jussac, Petit Munster Val de Weiss, Petit Munster fermier, Camembert Réo, Epoisses) gave an amplicon of 340 bp with *Carnobacterium* genus-specific Cb1-Cb2R primers. From these cheeses, after 10 d at 7°C, the enumeration of plates showed population levels of *Carnobacterium* spp. ≥10<sup>5</sup> cfu/g (Table 2). Colonies on modified TS-YE agar were nonpigmented, convex, circular, and smooth.

After the enrichment period, with the same primers Cb1-Cb2R, DNA extracted from 5 other cheeses [Pérail, Picodon, Petit Munster (Petits amis), Camembert Issigny, Petit Livarot] also gave one band of 340 bp (Table 2). In this case, the amount of *Carnobacterium* was ≤10<sup>2</sup> cfu/g.

With the species-specific primers, DNA extracted from these 10 cheeses showed a positive response with the *C. maltaromaticum*-specific primers Cpis-23S-7 (Figure 1A). With the 5 other species-specific primers,

Table 2. Detection of *Carnobacterium* spp. in French cheeses by the culture method and PCR, using primers Cb1-Cb2R, directly on the homogenate or after enrichment<sup>1</sup>

Cheese (brand name)	Milk type	Ripening time	Department code	pH ( $\pm$ 005)	Detection of <i>Carnobacterium</i> spp.		
					Direct PCR	On plate, log cfu/g	PCR after enrichment
Pérail (Lou Pérac)	Pasteurized ewe's	2 wk	Aveyron F 12.225.01 CEE	7.10	-	<2	+
Margalet (Monbrenac)	Pasteurized ewe's	2 to 3 wk	Aveyron F 12.299.20 CEE	7.10	-	<2	-
Brique de Jussac (Jussac)	Raw ewe's	3 wk	Haute-Loire F 43.162.02 CEE	7.47	+	6.2 $\pm$ 0.1	+
Rocamadour (Patrimoine gourmand) <sup>2</sup>	Raw goat's	1 to 4 wk	Lot F 46.177.01 CEE	6.80	-	<2	-
Crottin de Chavignol (Cora) <sup>2</sup>	Raw goat's	10 d	Cher F 18.194.50 CEE	6.50	-	<2	-
Cavet (Fermier)	Raw goat's	2 wk	Drôme F 26.114.01 CEE	4.76	-	<2	-
Picodon (Rians) <sup>2</sup>	Raw goat's	2 to 3 wk	Drôme F 26.011.01 CEE	6.80	-	<2	+
Le Chèvre de caractère (Soignon)	Raw goat's	2 to 3 wk	Vienne F 86.092.01 CEE	6.94	-	<2	-
Sainte Maure (Soignon) <sup>2</sup>	Raw goat's	2 to 5 wk	Deux-Sèvres F 79.276.01 CEE	6.50	-	<2	-
Coulommiers (Cœur de Lion)	Pasteurized cow's	>4 wk	Calvados F 14.762.01 CEE	7.40	-	<2	-
Coulommiers (Cora)	Pasteurized cow's	>4 wk	Ile et Vilaine F 35.239.01 CEE	7.67	-	<2	-
Brie (Cora) <sup>2</sup>	Pasteurized cow's	>4 wk	Vosges F 88.115.01 CEE	7.55	-	<2	-
Petit Munster (Frech) <sup>2</sup>	Pasteurized cow's	6 to 8 wk	Bas-Rhin F 67.216.01 CEE	7.10	-	<2	-
Petit Munster (Fermier) <sup>2</sup>	Pasteurized cow's	6 to 8 wk	Haut-Rhin F 68.249.02 CEE	7.05	-	<2	-
Petit Munster (Petits amis) <sup>2</sup>	Pasteurized cow's	6 to 8 wk	Haut-Rhin F 68.252.02 CEE	7.10	-	<2	+
Petit Munster (Val de Weiss) <sup>2</sup>	Pasteurized cow's	6 to 8 wk	Haut-Rhin F 68.175.01 CEE	7.64	+	6.6 $\pm$ 0.1	+
Petit Munster (Fermier) <sup>2</sup>	Raw cow's	6 to 8 wk	Bas-Rhin F 67.216.01 CEE	7.10	+	7.3 $\pm$ 0.1	+
Banon de Chalais (Bourdin)	Raw cow's	3 wk	Isère F 38.559.01 CEE	6.50	-	<2	-
Camembert de Normandie (Lanquetot) <sup>2</sup>	Raw cow's	>4 wk	Calvados F 14.478.01 CEE	6.69	-	<2	-
Camembert de Normandie (Lepetit) <sup>2</sup>	Raw cow's	>4 wk	Calvados F 14.422.01 CEE	7.26	-	<2	-
Camembert de Normandie (Patrimoine gourmand) <sup>2</sup>	Raw cow's	>4 wk	Calvados F 14.342.01 CEE	6.29	-	<2	-
Camembert de Normandie (Isigny Sainte Mère) <sup>2</sup>	Raw cow's	>4 wk	Calvados F 14.342.01 CEE	6.40	-	<2	+
Camembert de Normandie (Réo) <sup>2</sup>	Raw cow's	>4 wk	Manche F 50.267.01 CEE	7.10	+	7.80 $\pm$ 0.1	+
Epoisses (Lincet) <sup>2</sup>	Raw cow's	>4 wk	Haute Marne F 52.092.01 CEE	7.30	+	5.47 $\pm$ 0.1	+
Petit Pont-l'Évêque (Patrimoine gourmand) <sup>2</sup>	Raw cow's	>2 wk	Calvados F 14.342.01 CEE	7.40	-	<2	-
Petit Livarot (Lanquetot) <sup>2</sup>	Raw cow's	1 to 2 mon	Calvados F 14.478.01 CEE	7.96	-	<2	+
Langres (Germain) <sup>2</sup>	Thermic cow's	1 to 2 mon	Haute Marne F 52.092.01 CEE	6.80	-	<2	-
Chaource (Lanquetot) <sup>2</sup>	Thermic cow's	>2 wk	Aube F 10.399.01 CEE	7.13	-	<2	-
Camembert biologique (Cora)	Thermic cow's	>4 wk	Morbihan F 56.179.01 CEE	6.96	-	<2	-
Camembert (Président)	Thermic cow's	>4 wk	Calvados F 14.162.01 CEE	7.70	-	<2	-

<sup>1</sup>Results as expressed as means of 3 measures ( $\pm$  SD) of 3 samples purchased in October 2004 and in April 2005, and the data from October and April are computed together.

<sup>2</sup>AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) cheese.

**Table 3.** Oligonucleotides used for PCR amplification

Primer	Sequence	T <sub>m</sub> , °C	Reference
Cb1	5'-CCG TCA GGG GAT GAG CAG TTA C-3'	69	Nissen et al. (1994)
Cb2R	5'-ACA TTC GGA AAC GGA TGC TAA T-3'	69	Yost and Nattress (2000)
16S-2	5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT C-3'	56	Rachman et al. (2004)
23S-7	5'-GGT ACT TAG ATG TTT CAG TTC-3'	56	Rachman et al. (2004)
Cdiv	5'-TTC TAA AAA AAT AGT ACT CTT G-3'	56	Rachman et al. (2004)
Cgal	5'-TAG TTT CAC TCT AAA AAA AAC-3'	56	Rachman et al. (2004)
Cinh	5'-TTT TAT TTG CAC AAA TA-3'	50	Rachman et al. (2004)
Cmob	5'-CTC ATT TAA TTG CAC AAA AAG G-3'	58	Rachman et al. (2004)
Cpis	5'-TTT ATT TTT AAT TAA ATA CCC-3'	53	Rachman et al. (2004)
Cvir	5'-ATA AGT ATA AGA TGT TTT TT-3'	53	Rachman et al. (2004)

response was obtained (example with the specificity of *Carnobacterium divergens*; Figure 1B).

The colonies isolated from these 10 cheeses were purified and stained. They were rods that appeared singly in pairs, or in short chains, and were gram positive and catalase negative. Cells were nonmotile and nonspore-forming. They were tested by species-specific PCR and gave a response only with *C. maltaromaticum*-specific primers (data not shown).

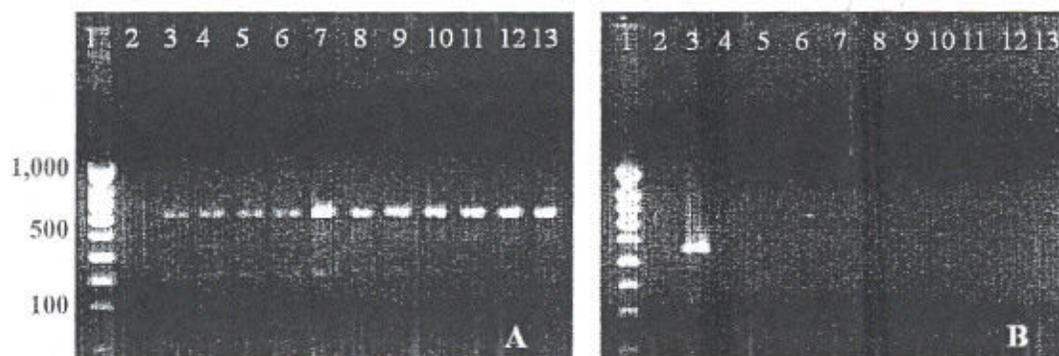
A comparison of their biochemical characteristics is given in Table 4. Among the 50 isolates from the 10 cheeses (5 colonies isolated from each positive cheese), 15 isolates from the API 50 CHL showed 6 differences in fermentation patterns. All isolates were consistent in their ability to produce acid from the following substrates normally fermented by carnobacteria:  $\beta$ -gentiobiosaccharose, *N*-acetyl glucosamine, amygdalin, arabinoside, esculin, salicin, maltose, cellobiose, D-mannose, D-glucose, and ribose (Table 4).

Like other carnobacteria, isolates did not produce acid from the following: erythritol, D-arabinose, L-xylofuranose,  $\beta$ -methyl-xyloside, rhamnose, dulcitol, D-melezitose, D-raffinose, glycogen, xylitol, D-lyx-

ose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, and L-arabitol (Table 4). Isolates from Camembert Réo (*C. maltaromaticum* reo), Epoisses (*C. maltaromaticum* epoisses), and Petit Munster (Petits amis; *C. maltaromaticum* amis) exhibited the same pattern, whereas Petit Munster (Fermier and Val de Weiss; *C. maltaromaticum* fermier and *C. maltaromaticum* weiss) and Isigny (*C. maltaromaticum* isigny) were identical. The other isolates, Pérail (*C. maltaromaticum* perail), Petit Livarot (*C. maltaromaticum* livarot), Brique de Jussac (*C. maltaromaticum* jussac) exhibited different patterns.

The ability to produce antagonistic substances against *L. monocytogenes* CIP 82110 was found with isolates from 3 different cheese samples, 1 from pasteurized ewe's milk (Pérail) and 2 from raw cow's milk (Réo and Epoisses). The diameter of inhibition against *L. monocytogenes* CIP 82110 for the 3 isolates tested was  $19 \pm 1.0$  mm.

The primers Cb1-Cb2R were used successfully to conduct a rapid screening of the genus in a wide variety of soft French cheeses. Thirty cheeses of 19 types that differed in the methods used in manufacture and ripening were analyzed. The presence and the number of



**Figure 1.** Electrophoresis in a 1.5% agarose gel of PCR amplification products with primers (A) Cpis-23S-7 and (B) Cdiv-23S-7. Lanes 1 to 13 in A and B are as follows: 1: 100 to 1,000 bp molecular weight ladder; 2: no template negative control; 3: *Carnobacterium maltaromaticum* A 28 (A) or *Carnobacterium divergens* DSM 20624<sup>T</sup> (B); 4: Pérail (Lou Pérac); 5: Brique de Jussac (Jussac); 6: Picodon (Rians); 7: Petit Munster (Petits amis); 8: Petit Munster (Val de Weiss); 9: Petit Munster (Fermier); 10: Camembert de Normandie (Isigny); 11: Camembert de Normandie (Réo); 12: Epoisses (Lincet); 13: Petit Livarot (Lanquetot). <sup>T</sup> = type strain.

**Table 4.** Comparison of the characteristics of the *Carnobacterium* strains isolated from cheeses with those of *Carnobacterium maltaromaticum*<sup>1</sup>

Item	DSM 20 730 <sup>T</sup>	LMA 28	Reo epoisses amis	Fermier weiss isigny	Livarot	Pérail	Jussac	Picodon
Glycerol	+	+	w	-	w	+	-	-
L-Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	w
D-Xylose	-	-	-	+	-	-	-	+
Galactose	-	w	-	+	+	-	+	w
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	+	-
Inositol	+	+	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	w	-	w	+	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	w	-	w	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	+	+	-	-	-	+	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	+	+	-	+	-	+	-	-
Lactose	+	+	-	-	+	+	-	w
Melibiose	-	-	-	+	-	-	+	-
Trehalose	+	+	+	+	w	+	+	-
Amidon	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	+	+	-	+	-	w	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	+	-	+	-
Gluconate	+	+	-	-	w	-	-	w

<sup>1</sup>Results from 5 isolates of each cheese: Réo (*C. maltaromaticum* reo), Epoisses (*C. maltaromaticum* epoisses), Petit Munster (Petits amis; *C. maltaromaticum* amis), Petit Munster (Fermier; *C. maltaromaticum* fermier), Petit Munster (Val de Weiss, *C. maltaromaticum* weiss), Isigny (*C. maltaromaticum* isigny), Petit Livarot (*C. maltaromaticum* livarot), Pérail (*C. maltaromaticum* perail), Brique de Jussac (*C. maltaromaticum* jussac), Picodon (*C. maltaromaticum* picodon). Isolates produced acid from the following:  $\beta$ -gentiobiose, saccharose, *N*-acetyl glucosamine, amygdalin, arbutine, esculin, salicin, maltose, cellobiose, D-mannose, D-fructose, D-glucose, and ribose. Isolates did not produce acid from the following: erythritol, D-arabinose, L-xylose, adonitol,  $\beta$ -methyl-xyloside, rhamnose, dulcitol, inulin, melezitose, D-raffinose, glycogen, xylitol, D-lyxose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol. + = positive response; - = negative response; w = weak response.

*Carnobacterium* in these cheeses, between 1 and 10<sup>7</sup> bacteria/g, were compatible with the amounts found previously (Millière et al., 1994; Millière and Lefebvre, 1994). This genus has been detected in cheeses manufactured in various departments in the East (Vosges, Bas-Rhin, Haute-Marne), in the West (Manche, Calvados), and in the South (Aveyron, Drôme, Haute-Loire) of France.

Ten positive samples with Cb1-Cb2R primers were also positive with the species-specific primers of *C. maltaromaticum*. The other *Carnobacterium* species (except *C. divergens*) were isolated from other sources, so it was not surprising that they were absent from the cheese (Collins et al., 1987; Franzmann et al., 1991; Joborn et al., 1999; Holley et al., 2002; Pikuta et al., 2005). On the other hand, the detection of *C. divergens*, previously found in cheeses (Millière and Lefebvre, 1994; Morea et al., 1999) was expected.

A previous study showed *Carnobacterium* only in cow's milk cheese (Millière et al., 1994). In this work, ewe's and goat's milk cheeses also contained this genus. The pH values of cheeses tested varied from 5.6 to 8.1, which are in the pH range required for the growth of the genus *Carnobacterium*. No correlations were found among the ripening of cheese, use of raw or pasteurized milk, and *C. maltaromaticum* counts. Cheeses con-

taining *Carnobacterium* did not differ significantly in taste or off-flavors from the same cheeses without *Carnobacterium* (Camembert, Munster). Eight cheeses were AOC cheeses, a designation that guarantees the quality of the product. The role of the *Carnobacterium* in these cheeses was therefore unclear.

Isolates from 3 different cheeses (1 from pasteurized ewe's milk, 2 from raw cow's milk) exhibited anti-*L. monocytogenes* activity. In raw milk soft cheese manufacturing, *L. monocytogenes* could be present at the end of the ripening period, with the rind being the preferential site of colonization. After food processing, this species can potentially grow in refrigerated products stored for extended periods. The anti-*Listeria* property of isolates from industrial cheeses should then be an advantage. Assuming that no product defect is related to the presence of *Carnobacterium*, it could be interesting to investigate their positive influence in the preservation of cheese.

## REFERENCES

- Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal, and F. Leroi. 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104:309-324.

- Cailliez-Grimal, C., R. Miguindou-Mabiala, M. Leseine, A. M. Revol-Junelles, and J. B. Milliere. 2005. Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. *FEMS Microbiol. Lett.* 250:163-169.
- Collins, M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu, and D. Jones. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:310-316.
- Connil, N., X. Dousset, B. Onno, M. F. Pilet, M. F. Breuil, and M. C. Montel. 1998. Enumeration of *Carnobacterium divergens* V41, *Carnobacterium piscicola* V1 and *Lactobacillus brevis* LB62 by in situ hybridization-flow cytometry. *Lett. Appl. Microbiol.* 27:302-306.
- Dalgaard, P., M. Vancanneyt, N. Euras Vilalta, J. Swings, P. Fruekilde, and J. J. Leisner. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. *J. Appl. Microbiol.* 94:80-89.
- De Medici, D., L. Croci, E. Delibato, S. Di Pasquale, E. Filetici, and L. Toti. 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3456-3461.
- Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval, and X. Dousset. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 47:33-42.
- Franzmann, P. D., P. Hopff, N. Weiss, and B. J. Tindall. 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.
- Giraffa, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:251-260.
- Holley, R. A., T. Y. Guan, M. Peirson, and C. K. Yost. 2002. *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1881-1885.
- Holzappel, W. H. 1992. Culture media for non-sporulating gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 17:113-133.
- Joborn, A., M. Dorsch, J. C. Olsson, A. Westerdahl, and S. Kjelleberg. 1999. *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1891-1898.
- Laursen, B. G., L. Bay, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, J. Swings, P. Dalgaard, and J. J. Leisner. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: Phenotypic and genotypic characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:151-164.
- Marilley, L., and M. G. Casey. 2004. Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90:139-159.
- Mayr-Hastig, A., A. J. Hedges, and R. C. M. Berkeley. 1972. Methods for studying bacteriocins. Vol. 7A. Pages 315-422 in *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York, NY.
- Millière, J. B., and G. Lefebvre. 1994. *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheeses from cow's raw milk. *Neth. Milk Dairy J.* 48:19-30.
- Millière, J. B., M. Michel, F. Mathieu, and G. Lefebvre. 1994. Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 76:264-269.
- Morea, M., F. Baruzzi, and P. S. Cocconcelli. 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *J. Appl. Microbiol.* 87:574-582.
- Nissen, H., A. Holck, and R. H. Dainty. 1994. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:165-168.
- Paludan-Muller, C., P. Dalgaard, H. H. Huss, and L. Gram. 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* 39:155-166.
- Pikuta, E. V., D. Marsic, A. Bej, J. Tang, P. Krader, and R. B. Hoover. 2005. *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:473-478.
- Pilet, M. F., X. Dousset, R. Barré, G. Novel, M. Desmazeaud, and J. C. Piard. 1994. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 58:256-262.
- Rachman, C., P. Kabadjova, R. Valcheva, H. Prevost, and X. Dousset. 2004. Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4468-4477.
- Yost, C. K., and F. M. Nattress. 2000. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:129-133.

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Paul Henri AMVAM ZOLLO, Professeur, Université de Ngaoundéré, Cameroun**

**Monsieur Pascal DEGRAEVE, Maître de Conférences, Université Claude Bernard 1, Bourg-en-Bresse**

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

**Madame Hélène Carole EDIMA**

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

**"*Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et  
potentialités en technologie fromagère"**

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

en vue de l'obtention du titre de :

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

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 28 août 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

