



**HAL**  
open science

## Croissance des bactéries propioniques dans le fromage : comparaison de 2 milieux de dénombrement

Anne Thierry, Mn Madec, R Richoux

► **To cite this version:**

Anne Thierry, Mn Madec, R Richoux. Croissance des bactéries propioniques dans le fromage : comparaison de 2 milieux de dénombrement. *Le Lait*, 1994, 74 (3), pp.161-171. hal-00929388

**HAL Id: hal-00929388**

**<https://hal.science/hal-00929388>**

Submitted on 11 May 2020

**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.

## Croissance des bactéries propioniques dans le fromage : comparaison de 2 milieux de dénombrement

A Thierry<sup>1</sup>, MN Madec<sup>1</sup>, R Richoux<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de recherche de technologie laitière,  
INRA, 65, rue de St-Brieuc, 35042 Rennes cedex;

<sup>2</sup> ITG, 73, rue de St-Brieuc, 35062 Rennes cedex, France

(Reçu le 12 janvier 1994; accepté le 11 février 1994)

**Résumé** — La cinétique de croissance de flores propioniques «sauvages» ou réensemencées a été étudiée au cours de l'affinage de mini-fromages de type emmental. Le dénombrement des bactéries propioniques dans des fromages de flore de complexité variable a été effectué de manière comparative sur les milieux LGA (lithium-glycérol-agar) et YELA (yeast-extract-lactate-agar). La diversité de la population propionique a été appréciée par la comparaison des profils de restriction d'ADN en électrophorèse en champs pulsés des colonies isolées en cours d'affinage. Dans le cas de fromages fabriqués à partir de lait thermisé, la flore propionique «sauvage» était composée d'au moins 10 souches différentes (10 profils distincts sur 16). Son temps de génération en cave chaude était de 18,8 h. Dans le cas d'une fabrication effectuée à partir de lait thermisé, microfiltré et réensemencé avec *P freudenreichii* subsp *shermanii* TL 30, seul le profil de restriction d'ADN de la souche inoculée a pu être mis en évidence à partir des bactéries propioniques isolées. Leur temps de génération en cave chaude était de 18,1 h. Dans un fromage témoin (fabriqué à partir de lait microfiltré non réensemencé), la flore propionique «sauvage» se situait à un niveau inférieur de 3 à 6 logarithmes décimaux à la flore propionique du fromage réensemencé; son temps de génération était de 25,6 h. Pour ces 3 fabrications, la sélectivité du milieu LGA s'est révélée supérieure à celle du milieu YELA, ce qui s'est traduit par des dénombrements de la flore totale se développant sur LGA inférieurs de 1 à 2 logarithmes décimaux au dénombrement de la flore totale sur YELA. Malgré cette sélectivité supérieure du milieu LGA, la différenciation des colonies de bactéries propioniques et leur dénombrement sur ces 2 milieux se sont révélés de difficulté équivalente, en particulier dans les fromages au lait thermisé où une flore complexe provenant du lait se développe.

**bactérie propionique / emmental / temps de génération / milieu sélectif / dénombrement**

**Summary** — Growth of propionibacteria in cheese: comparison between 2 enumeration media. Growth of 'wild' or inoculated propionibacteria has been studied during ripening of experimental, Swiss-type cheeses. Two media have been compared regarding their ability to be used for counting propionic acid bacteria in cheeses of various complex flora: LGA (lithium-glycerol-agar) et YELA (yeast-extract-lactate-agar). In order to characterize the strain variety among propionic flora, DNA restriction patterns have been established for several colonies isolated throughout ripening using pulsed

field gel electrophoresis. Propionic flora of cheeses made with thermized milk was composed of at least 10 different strains (10 distinct patterns out of 16). Generation time of this flora during warm room ripening was equal to 18.8 h. For cheeses made with microfiltered thermized milk inoculated with pure culture of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* TL 30, only the DNA restriction pattern of the inoculated strain could be found among isolated propionibacteria. They had a generation time during warm room ripening of 18.1 h. In cheeses made from the same milk without further inoculation with propionibacteria starter, propionic flora enumerated on LGA was markedly lower compared to propionic flora of inoculated cheeses (3 to 6 decimal logarithms less). For all the cheeses, a higher selectivity has been observed for LGA, on which total bacterial counts are lower than total bacterial counts on YELA (1 to 2 decimal logarithms less). However, despite this higher selectivity of LGA, the difficulty in differentiating and so enumerating propionic acid bacteria colonies was similar for both media.

**propionic acid bacteria / emmental / generation time / selective medium / enumeration**

## INTRODUCTION

Les bactéries propioniques jouent un rôle essentiel dans l'affinage des fromages à pâte pressée cuite de type emmental, dans lesquels elles fermentent le lactate produit par les bactéries lactiques en propionate, acétate et CO<sub>2</sub>, contribuant ainsi au goût caractéristique et à l'ouverture de ces fromages. Les travaux décrivant leur cinétique de croissance au sein du fromage sont en nombre relativement réduit (Hettinga *et al*, 1974 ; Fryer et Peberdy, 1977 ; Gilles *et al*, 1983 ; Baer *et al*, 1993).

L'absence d'oses et les conditions d'incubation en anaérobiose confèrent un certain degré de sélectivité aux milieux généralement utilisés pour le dénombrement des bactéries propioniques, tels le YELA (*yeast-extract-lactate-agar*, Hettinga *et al*, 1968) ou le TLA (*trypticase-lactate-agar*, Peberdy et Fryer, 1976). Cette sélectivité reste cependant insuffisante vis-à-vis des microorganismes du fromage et nécessite donc le contrôle de l'appartenance au genre *Propionibacterium* des colonies dénombrées (Baer *et al*, 1993).

Plusieurs tentatives ont été effectuées pour accroître la sélectivité du milieu YELA vis-à-vis de la flore du lait et/ou du fromage, par addition de divers composés inhibiteurs (Kurmman, 1962 ; Britz et Holzapfel, 1973 ; Peberdy et Fryer, 1976 ; Tomes *et al*, 1991 ;

Drinan et Cogan, 1992). Si la plupart des levains lactiques sont inhibés sur ces milieux, il apparaît que les lactobacilles mésophiles ou les entérocoques s'y développent également. Madec *et al* ont proposé en 1993 un milieu sélectif de dénombrement des bactéries propioniques, fondé sur la résistance au lithium de ces bactéries et leur aptitude à fermenter le glycérol en anaérobiose.

Le but de ce travail était de comparer l'aptitude de ce dernier milieu «lithium-glycérol-agar» (LGA) et du milieu YELA au dénombrement des bactéries propioniques «sauvages» ou réensemencées au cours de la fabrication de mini-fromages emmental de flores de complexité variable.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### *Fabrication et échantillonnage*

Du lait écrémé et de la crème issus de lait de grand mélange, provenant de l'atelier Compagnie laitière européenne (Montauban de Bretagne, France) ont été mis en œuvre dans cette étude. Ils y avaient subi une thermisation (63°C, 20 s). Ce lait a été partagé en 3 lots ayant subi les traitements suivants :

– lot TH: le lait thermisé réceptionné était simplement standardisé à 28 g/l de matière grasse par ajout de crème thermisée, puis stocké 12 h à 4°C avant fabrication ;

– lot MF (microfiltré) : le lait écrémé thermisé était réchauffé à 50°C puis épuré par microfiltration comme décrit par Trouvé *et al* (1991) sur une installation pilote de type Bactocatch (MFS1, Alfa Laval) équipée de membranes céramiques de diamètre moyen de pores de 1,4 µm ; le lait microfiltré refroidi à 4°C était ensuite standardisé à 28 g/l de matière grasse par de la crème ayant subi un traitement thermique de 115°C/20 s, puis stocké à 4°C pendant 36 h avant utilisation ;

– lot MFR (microfiltré réensemencé) : une fraction du lait MF (microfiltré standardisé), stockée 60 h à 4°C, a été inoculée par 0,01% (v/v) d'une culture de 2 j à 30°C de *Propionibacterium freudenreichii* subsp *shermanii* TL30.

Trois séries de fabrications de mini-fromages ont été réalisées, à 24 h d'intervalle, à partir d'un même lot de lait, ce qui nous a contraints à stocker ce lait à 4°C entre 12 et 60 h avant utilisation. Les mini-fabrications de fromage étaient conduites suivant le protocole habituel de l'Institut technique du gruyère (Buisson *et al*, 1987 ; ITG, 1991 ; 1993). Les levains commerciaux employés étaient composés d'une association de ferments thermophiles (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* et *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*) et de ferments mésophiles (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*).

Pour chaque lot de lait, trois mini-fromages ont été fabriqués à partir de 10 l de lait chacun. Après saumurage, chaque fromage était découpé en 8 portions. Celles-ci étaient paraffinées et affinées dans des armoires thermostatisées pendant 21 j à 11°C (cave froide), puis 28 j à 24°C (cave chaude). Au cours des fabrications, les contrôles habituels de coagulation, d'acidification et d'égouttage étaient pratiqués (ITG, 1991).

Pendant l'affinage en cave chaude, une portion de chaque fromage était prélevée au hasard. Elle était découpée en 2 échantillons, l'un pour l'analyse microbiologique immédiate, l'autre, congelé à -18°C, pour les analyses physicochimiques. Ces prélèvements étaient effectués après 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 et 28 j de cave chaude.

### Analyses physicochimiques

Le lactate a été dosé par méthode enzymatique (Boehringer Mannheim Meylan, France). Les teneurs en acides acétique et propionique ont

été déterminées par chromatographie en phase gazeuse (Berdagué, 1986).

### Numérations bactériennes

Des échantillons de 10 g de fromage ont été broyés au waring blender (Labo-Standa, Caen, France) dans 90 ml de citrate de sodium (2% p/v). La flore mésophile aérobie était dénombrée sur Plate Count Agar (PCA) (Biokar, Beauvais, France) après incubation 3 j à 30°C.

Les dénombrements de bactéries propioniques ont été effectués en parallèle sur les milieux YELA (Hettinga *et al*, 1968) et le milieu développé par Madec *et al* (1993), que nous avons appelé LGA (lithium-glycérol-agar) dans cette étude. Le pH des 2 milieux a été ramené à 7,0 avant autoclavage (121°C, 15 min). Les boîtes de Petri ont été incubées en anaérobiose (Anaerocult, Merck, Nogent sur Marne, France) à 30°C pendant 6 j.

Afin d'apprécier, pour les milieux YELA et LGA, d'une part, le caractère sélectif (croissance exclusive de la flore propionique) et d'autre part, la facilité de lecture des boîtes (différenciation des colonies formées par la flore propionique), 2 comptages distincts ont été effectués sur chaque milieu : la flore totale capable de se développer sur le milieu et la flore propionique. Les bactéries propioniques étaient dénombrées sur les 2 milieux par comptage des colonies de couleur crème de diamètre supérieur à 2 mm. Sur LGA, l'observation d'un halo de décoloration traduisant la fermentation du glycérol (virage du pourpre de bromocrésol du violet au jaune) s'ajoute à ces 2 critères.

L'appartenance au genre *Propionibacterium* des souches « typiques » isolées sur YELA et LGA a été vérifiée par dosage HPLC de l'acide propionique produit (Boyaval et Corre, 1987) après culture sur YEL (YELA sans agar) pendant 48 h. Les souches bactériennes productrices d'acide propionique ont été identifiées sur galeries API 50CH (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). Les souches bactériennes non productrices d'acide propionique ont été identifiées grâce aux galeries API suivantes (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) : API 20Strept (pour les coques par paires ou en chaînettes, Gram+, catalase-), API 20E (pour les bacilles Gram-) et API 50CH (pour les bacilles Gram+, catalase-, isolés ou en chaînettes).

## Électrophorèse en champs pulsés

La différenciation des colonies de bactéries propioniques isolées à partir des fromages a été réalisée par comparaison des profils de restriction de l'ADN chromosomique obtenus après électrophorèse en champs pulsés dans les conditions opératoires suivantes : enzyme de restriction : *Xba*I, gel à 1% agarose, 6 V/cm, 14°C, rampe de 1 à 20 s pendant 20 h (Gautier *et al*, 1992).

## RÉSULTATS

### Analyses physicochimiques des fromages

Les paramètres de fabrication sont en accord avec les valeurs habituelles relevées lors de ce type de fabrication après 30 min de pressage :

- extrait sec : de 57,1 à 59,6% ;
- extrait sec dégraissé : de 30,4 à 31,9% ;
- humidité/extrait sec dégraissé : de 1,26 à 1,41.

Le pH en fin d'acidification (à 20 h) était compris entre 5,15 et 5,18. L'évolution des teneurs en lactate, acétate et propionate des fromages issus de lait microfiltré correspondent aux valeurs habituellement enregistrées lors de ce type de fabrication (ITG, 1993).

Seuls les fromages fabriqués à partir de lait non microfiltré (TH) ou de lait réensemencé après microfiltration (MFR) présentent une ouverture, détectable respectivement après 1 et 2 semaines d'affinage en cave chaude.

### Croissance des bactéries propioniques

Les figures 1A, 1B et 1C correspondant respectivement aux fabrications TH, MF et MFR décrivent la cinétique de croissance

pendant l'affinage en cave chaude des bactéries propioniques (dénombrées sur les milieux YELA et LGA) et de la flore totale dénombrable sur les milieux PCA, YELA et LGA. Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes des résultats obtenus pour les trois répétitions.

### Fabrication à partir de lait thermisé (lot TH, fig 1A)

La flore aérobie mésophile et la flore propionique du lait de fabrication s'élevaient respectivement à  $2,3 \cdot 10^4$  et  $2,4 \cdot 10^2$  UFC/ml. Le dénombrement des bactéries propioniques sur YELA et LGA a conduit à des résultats similaires. Les bactéries propioniques s'élevaient à  $5 \cdot 10^2$  UFC/g dans le caillé au moulage. Leur croissance n'a pas été discernable avant le début de l'affinage en cave chaude, puis leur nombre s'est accru rapidement à  $10^8$  UFC/g après 2 semaines, pour atteindre  $10^9$  UFC/g en fin d'affinage en cave chaude. La concentration en lactate décroît de 183 à 104 mmol/kg de fromage au cours de l'affinage en cave chaude. La production de propionate n'est pas détectable avant 2 semaines d'affinage et atteint 37 mmol/kg de fromage après 4 semaines en cave chaude.

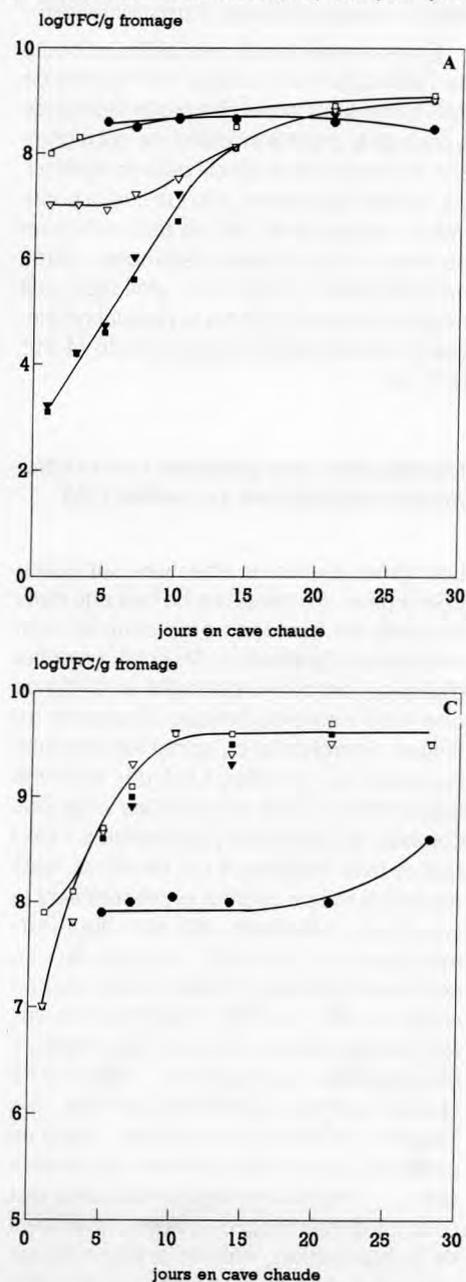
### Fabrication à partir de lait thermisé microfiltré (lot MF, fig 1B)

La flore totale du lait après microfiltration a été réduite de  $2,3 \cdot 10^4$  UFC/ml à environ 10 UFC/ml, ce qui correspond à un facteur de réduction décimale de 3,4 compris dans la fourchette de 2,12 à 3,63 obtenue par Trouvé *et al* (1991) pour divers micro-organismes du lait. Le stockage avant fabrication (36 h à 4°C) du lait microfiltré a entraîné cependant une augmentation de sa flore totale à  $5 \cdot 10^2$  UFC/ml.

La flore propionique est trop faible pour être dénombrée après microfiltration. L'application à la flore propionique initiale

( $2,4 \cdot 10^2$  UFC/ml) du facteur de réduction décimale de 2,18 obtenue pour *Propionibacterium* par Trouvé *et al* (1991) conduit à moins de 2 bactéries propioniques par

millilitre de lait microfiltré. Du fait du nombre très limité de bactéries propioniques en début d'affinage lors de cette fabrication, les premiers dénombrements ne sont pas fiables.



**Fig 1.** Croissance de différentes flores bactériennes pendant l'affinage en cave chaude de mini-fromages de type emmental. **A** : Fabriqué à partir de lait thermisé (TH) ; **B** : fabriqué à partir de lait thermisé microfiltré (MF) ; **C** : fabriqué à partir de lait thermisé microfiltré réensemencé par *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (MFR). Flore totale dénombrable sur : ● PCA ; □ YELA ; ▽ LGA ; flore propionique dénombrable sur : ■ YELA ; ▼ LGA.

*Growth of different bacterial flora during ripening in warm room of experimental emmental cheeses made of experimental emmental cheeses made. A*: From thermized milk (TH); *B*: from thermized microfiltered milk (MF); *C*: from thermized microfiltered milk inoculated with pure culture of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (MFR). Total bacterial counts on: ● PCA; □ YELA; ▽ LGA; propionibacteria counts on: ■ YELA; ▼ LGA.

Après 10 j en cave chaude, la flore propionique s'élevait à  $10^3$  UFC/g de fromage, sa croissance s'est effectuée de manière exponentielle jusqu'à environ  $10^6$  puis a ralenti pour se stabiliser autour de  $3 \cdot 10^6$  UFC/g de fromage. La teneur en lactate reste sensiblement égale à 150 mmol/kg de fromage, tandis que la production de propionate ne dépasse pas 3 mmol/kg de fromage après 4 semaines en cave chaude.

### **Fabrication au lait microfiltré réensemencé (lot MFR, fig 1C)**

L'inoculation en bactéries propioniques a été effectuée à raison de  $4 \cdot 10^5$  UFC/ml. La population s'est accrue de  $10^7$  UFC/ml en début de cave chaude à  $4 \cdot 10^9$  UFC/ml après 10 j et se stabilise à ce niveau. La totalité du lactate (164 mmol/kg en début d'affinage cave chaude) a été utilisée en fin d'affinage, les productions d'acides propionique et acétique ont respectivement atteint 118 et 54 mmol/kg.

### **Isolement et identification des bactéries propioniques**

Cinquante à 100 colonies de bactéries propioniques ont été isolées au cours de l'affinage pour chaque fabrication, afin d'évaluer la diversité de la flore présente. Parmi les colonies isolées, les cultures présentant des caractères distincts lors de la croissance sur YEL ont été présélectionnées. L'analyse des profils de restriction d'ADN par électrophorèse en champs pulsés a été effectuée sur 16 colonies «sauvages» ainsi présélectionnées à partir d'une fabrication non ensemencée en bactéries propioniques (TH). Dix profils distincts ont pu être mis en évidence, ce qui laisse supposer qu'un grand nombre de souches sont présentes et se développent simultanément pendant l'affinage. Du fait du nombre réduit de colonies analysées par cette méthode, il n'a pas été

possible de mettre en évidence la prédominance d'une ou plusieurs souches. Les profils biochimiques de ces dix souches, établis sur galeries API 50CH, correspondent à ceux de l'espèce *P. freudenreichii*.

En revanche, les clones isolés au cours de l'affinage du fromage réensemencé (MFR) montrent toutes des profils identiques à celui de la souche inoculée, ce qui montre son développement effectif dans le fromage. Ce résultat était attendu du fait que la population résiduelle du lait de fabrication en bactéries propioniques «sauvages» après microfiltration ( $<10$  UFC/ml) était tout à fait négligeable par rapport à la population élevée du levain propionique inoculé ( $4 \cdot 10^5$  UFC/ml).

### **Identification des bactéries non propioniques dénombrées sur milieu LGA**

Les dénombrements effectués sur milieu LGA à partir d'échantillons de fromage dans lesquels les bactéries propioniques sont minoritaires (fabrications TH et MF en début d'affinage) ont permis de mettre en évidence une flore non propionique résistante au lithium. Parmi celle-ci, certaines souches formaient sur le milieu LGA des colonies susceptibles d'être confondues avec des colonies de bactéries propioniques : bien que de taille inférieure à ces dernières, elles avaient la même couleur et présentaient le caractère «acidifiant» sur ce milieu (fermentation du glycérol). Aucune de ces souches ne produit d'acide propionique en culture de 48 h sur YEL. Parmi les colonies les plus acidifiantes sur LGA, 6 souches ont été identifiées au moyen de galeries API. Quatre ont été identifiées comme des souches d'*Enterococcus durans*, une a un profil de *Lactobacillus curvatus*, la dernière étant un *Enterobacter aerogenes*. Deux des souches d'entérocoques isolées provenaient de la fabrication réalisée à partir de lait microfiltré. Afin de rechercher leur origine

possible, des isollements ont été effectués sur milieu LGA à partir des levains lactiques utilisés en fabrication et de la saumure. Une souche d'*Enterococcus durans* a pu être isolée du levain de *Lactobacillus helveticus* ainsi que des souches identifiées comme *Lactococcus lactis* présentant également, mais à un moindre degré, le caractère «acidifiant» sur LGA. Une souche d'*Enterococcus faecium* a également été isolée de la saumure.

## DISCUSSION

### Comparaison des milieux YELA et LGA

#### Sélectivité

Lorsque les bactéries propioniques sont majoritaires, la flore totale dénombrée sur YELA et LGA correspond à la flore propionique et se situe à un niveau supérieur à la flore totale dénombrée sur PCA, sur lequel les bactéries propioniques ne se développent pas dans les conditions d'incubation utilisées (aérobiose).

En revanche, lorsque la population de bactéries propioniques n'est pas dominante, le dénombrement de la flore totale poussant sur YELA (6 j à 30°C en anaérobiose) a conduit aux mêmes valeurs que le dénombrement sur PCA (3 j à 30°C en aéro-biose), ce qui met en évidence l'absence de sélectivité du milieu YELA vis-à-vis des micro-organismes du fromage. Compte-tenu des valeurs élevées trouvées dans les fabrications effectuées à partir de lait microfiltré, il est vraisemblable que cette flore est principalement composée de bactéries lactiques aéro-anaérobies facultatives provenant des levains, capables de se développer dans différentes conditions d'incubation (Baird *et al*, 1987).

Pour les 3 fabrications, la flore totale dénombrable sur LGA a été inférieure de 1

à 2 logarithmes décimaux à la flore totale poussant sur YELA, ce qui traduit un degré de sélectivité supérieur du milieu LGA.

Cet écart de dénombrement de flore totale entre les 2 milieux peut s'élever (jusqu'à 3,5 logarithmes décimaux), en particulier en début d'affinage pour les fromages fabriqués à partir de lait microfiltré non ensemencé en bactéries propioniques (essai MF) où la flore dominante n'est constituée en début d'affinage que par les levains lactiques. Ceci traduit le fait que les bactéries lactiques mises en œuvre en fabrication d'emmental ne se développent pas sur le milieu LGA et confirme les résultats obtenus par Madec *et al*, (1993) avec des cultures pures de diverses bactéries lactiques.

#### Différenciation des colonies de bactéries propioniques

Pour les 3 fabrications, le dénombrement des bactéries propioniques sur YELA et sur LGA a conduit à des résultats similaires. Il semble cependant que le milieu LGA présente un meilleur seuil de détection, en améliorant la «lecture» des boîtes lorsque la flore propionique présente dans l'échantillon est très basse. C'est le cas des dénombrements effectués en tout début d'affinage sur les fromages MF, pour lesquels la population propionique est inférieure à 100 UFC/g de fromage. Dans le lait de fabrication et le caillé frais, le dénombrement des bactéries propioniques se révèle très délicat sur les 2 milieux. En effet, dans la pratique, le critère de décoloration décrit pour la reconnaissance des bactéries propioniques sur LGA (Madec *et al*, 1993), à savoir l'observation de halos de décoloration autour des colonies de bactéries propioniques n'est pas toujours utilisable : selon le niveau et la nature de la flore résistante au lithium poussant sur ce milieu, la totalité de la culture peut virer au violet pâle ; la difficulté de «lecture» des milieux LGA et YELA est alors

identique. Par ailleurs, des colonies de bactéries non propioniques présentant le caractère «acidifiant», bien qu'étant dénombrées à des dilutions 100 à 10 000 fois plus fortes que les bactéries propioniques, peuvent entraîner des dénombrements erronés si des précautions ne sont pas prises. Ces «faux-positifs» sont observés tant que la population propionique n'est pas dominante (fabrication MF et 10 premiers jours d'affinage en cave chaude pour la fabrication TH). L'aptitude à fermenter le glycérol, peu répandue parmi les bactéries lactiques, est cependant retrouvée chez certains lactobacilles mésophiles (Zanoni *et al*, 1987 ; Collins *et al*, 1989) et entérocoques (Mundt, 1986). Ces micro-organismes font partie de la flore capable de se développer pendant l'affinage des pâtes pressées cuites (Sharpe, 1962 ; Efthymiou *et al*, 1974). L'origine de cette flore secondaire, parmi laquelle les entérocoques semblent tenir une place prépondérante, n'a pas été déterminée de façon certaine. La présence d'entérocoques dans un des levains commerciaux employé et dans la saumure peut expliquer cependant le fait que des souches d'*Enterococcus durans* aient été retrouvées dans les fromages fabriqués à partir de lait microfiltré, dans lequel la flore totale n'excédait pas  $5 \cdot 10^2$  UFC/ml. La résistance thermique des entérocoques (Sanz Perez *et al*, 1982) peut expliquer leur présence dans les fromages fabriqués à partir de lait thermisé.

En conclusion, le milieu LGA a une sélectivité élevée vis-à-vis des levains lactiques mais présente les limites d'utilisation qui viennent d'être décrites pour dénombrer les bactéries propioniques dans les fromages fabriqués à partir de lait peu épuré (thermisé), dans lesquels une flore complexe, provenant du lait, se développe pendant l'affinage. Cette constatation a donné lieu à l'amélioration de la sélectivité du milieu LGA vis-à-vis de la flore du lait (Madec *et al*, 1994).

### **Croissance des bactéries propioniques**

Les principales données sur la cinétique de croissance des bactéries propioniques pendant l'affinage de fromages expérimentaux de type emmental ont été comparées (tableau I). Les populations finales atteintes par les bactéries propioniques sont respectivement de 9,0 et 9,5 log UFC/g pour les fabrications effectuées au lait thermisé (TH) et microfiltré réensemencé (MFR). Ces niveaux de population sont comparables à ceux qui ont été reportés dans le cas de fromages expérimentaux (Hettinga *et al*, 1974 ; Fryer et Peberdy, 1977 ; Gilles *et al*, 1983 ; Turner *et al*, 1983 ; Baer *et al*, 1993) ou de fromages commerciaux (Steffen *et al*, 1986). Ces niveaux de population ne sont cependant pas atteints au même stade d'affinage en cave chaude pour les fabrications TH et MFR, mais après respectivement 2 et 4 semaines.

L'analyse des profils de restriction d'ADN confirme que seul le levain propionique mis en œuvre se développe dans les fromages MFR. Les taux de croissance des bactéries propioniques ont été très voisins (respectivement 18,6 et 18,1) pour les 2 fabrications TH et MFR, bien qu'il s'agisse de 2 populations très différentes dans chaque cas : une culture «sauvage» multi-souches dans le cas de la fabrication TH, une culture pure de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* TL 30 dans le cas de la fabrication MFR.

Dans le cas des fromages fabriqués à partir de lait microfiltré non réensemencé en bactéries propioniques (MF), la croissance des bactéries propioniques est plus lente (temps de génération égal à 25,6 h), la population finale atteinte par les bactéries propioniques n'est que de 6,8 log UFC/g et la production d'acide propionique se situe à la limite de détection. L'essai MF n'a malheureusement pas pu être prolongé pour confirmer la stabilisation de la flore propionique à ce niveau.

**Tableau I.** Cinétique de croissance des bactéries propioniques au cours de l'affinage en cave chaude de fabrications expérimentales de type emmental.*Growth of propionibacteria during warm room ripening of experimental Swiss-type cheeses.*

Paramètres de fabrication			Croissance Propionibacterium				Tg (h)	Référence
Traitement lait	pH à 24 h	Température cave chaude °C	Inoculum (µl/lait)	log UFC/ml				
				entrée CC	milieu CC	fin CC		
TH	5,17	24	0	2,8	8,1	9,0	18,8	Cette étude
MF	5,17	24	0	< 1	4,6	6,8	25,6	Cette étude
MFR	5,15	24	100	6,5	9,5	9,5	18,1	Cette étude
P	(1)-	-	-	6,4	9,4		18#	Hettinga <i>et al</i> , 1974
P	5,37	21-22	75	6,2	8,1	9,0	41#	Fryer & Peberdy, 1977
P	5,15-5,30	22	15	6,5	8,7	9,0	46#	Gilles <i>et al</i> , 1983
P	5,0	22	15	6,3	9,0	-	25#	Turner <i>et al</i> , 1983
-	-	-	0,0005#	< 1	6,8	9,1	30#	Baer <i>et al</i> , 1993
			0,083#	3,2	8,8	9,2	35#	Baer <i>et al</i> , 1993
			5#	5,4	8,8	9,4	38#	Baer <i>et al</i> , 1993

TH, MF, MFR : voir texte ; P: pasteurisé ; CC : cave chaude ; entrée : 0 ou 1 j ; milieu : 14 j ; fin : 28 j ; sauf pour Baer *et al*, 1993 : 5, 45 et 90 j. Tg : temps de génération ; # calculé d'après les données des auteurs (hypothèse : inoculum à 9,7 ufc/ml) ; (1) - : donnée non disponible.

TH, MF, MFR: see text; P: pasteurized; CC: warm room; entrée: 0 to 1 d; milieu: 14 d; fin: 28 d; except for Baer *et al*, 1993: 5, 45 and 90 d. Tg: generation time; # calculated from authors data (hyp: inoculum at 9.7 log cfu/ml); (1) -: not available data.

La différence entre les temps de génération observés pour cette fabrication d'une part et les essais TH et MFR d'autre part, peut être due au développement d'une flore contaminante inhabituelle susceptible d'inhiber le développement des bactéries propioniques ou à la nature de la population propionique présente ou encore à une combinaison de ces facteurs.

Les valeurs des temps de génération obtenus pendant l'affinage des fromages TH et MFR sont voisines de celles que nous avons calculées à partir des données obtenues par Hettinga *et al* (1974) et Turner *et al* (1983) lors de fabrications de fromages emmentalensemencés avec une souche de *P freudenreichii* subsp *shermanii*. En revanche, dans d'autres fabrications expérimentales d'emmental décrites par Fryer et Peberdy (1977), Gilles *et al* (1983) et Baer *et al* (1993), ensemencées à différents niveaux par *P freudenreichii*, les temps de génération des bactéries propioniques observés en cave chaude (21–22°C), compris entre 30 et 46 h, étaient supérieurs à ceux obtenus dans cette étude.

Les connaissances concernant les cinétiques de croissance des bactéries propioniques dans le fromage sont limitées. Cependant, les différences considérables de comportement des bactéries propioniques en milieu liquide et la connaissance de la sensibilité de certaines souches à des facteurs tels que de faibles différences de pH autour de 5,0–5,5 (Langsrud et Reinbold, 1973) peuvent suffire pour rendre compte des variations observées du taux de croissance.

## RÉFÉRENCES

- Baer A, Ryba I, Grand M (1993) Ursachen der Entstehung von braunen Tupfen im Käse. *Schweiz Milchw Forschung* 22, 3-7
- Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW (1987) Pharmacopoeia of culture media for food microbiology. *Int J Food Microbiol* 5, 187-300
- Berdagué JL (1986) Méthode d'extraction rapide des acides gras volatils des fromages. *Lait* 66, 223-246
- Boyaval P, Corre C (1987) Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle. *Biotechnol Lett* 9, 801-806
- Britz TJ, Holzapfel WH (1973) The suitability of different media for the isolation and enumeration of propionibacteria from dairy products. *S Afr J Dairy Technol* 5, 213-216
- Buisson V, Kerjean JR, Courroye M (1987) Miniaturisation de la fabrication fromagère, un nouveau test pour mesurer l'aptitude fromagère des laits. *Tech Lait* 1024, 17-23
- Collins MD, Phillips BA, Zaroni P (1989) Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp nov, subsp *paracasei* and subsp *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp nov, comb nov. *Int J Syst Bacteriol* 39, 105-108
- Drinan FD, Cogan TM (1992) Detection of Propionibacteria in cheese. *J Dairy Res* 59, 1-5
- Efthymiou CJ, Baccash P, Labombardi VJ, Epstein DS (1974) Improved isolation and differentiation of enterococci in cheese. *Appl Microbiol* 28, 417-422
- Fryer TF, Peberdy MF (1977) Growth of propionibacteria in Swiss and Egmont cheese. *N Z J Dairy Sci Technol* 12, 133-134
- Gautier M, Mouchel N, Rouault A, Sanseau P (1992) Determination of genome size of four *Propionibacterium* species by pulsed-field gel electrophoresis. *Lait* 72, 421-426
- Gilles J, Turner KW, Martley FG (1983) Swiss-type cheese. I. Manufacturing and sampling procedures. *NZ J Dairy Sci Technol* 18, 109-115
- Hettinga DH, Vedamuthu ER, Reinbold GW (1968) Pouch method for isolating and enumerating propionibacteria. *J Dairy Sci* 52, 1707-1709
- Hettinga DH, Reinbold GW, Vedamuthu ER (1974) Split defect of Swiss cheese I. Effect of strain of propionibacteria and wrapping material. *J Milk Food Technol* 37, 322-328
- ITG (1991) Minifabrication de fromages à pâte pressée cuite : les choix de l'ITG depuis 1987. „Etude ITG/ZO/1991/02/B (Edition ITG, La Roche-sur-Foron, France)
- ITG (1993) Aptitude technologique de bactéries propioniques laitières. Étude en minifabrica-

- tion. Étude ITG/ZO/1993, sous presse (Edition ITG, La Roche sur Foron, France)
- Kurmann J (1962) Eine Methodische Verbesserung zur Bestimmung des Propionsäurebakteriengehaltes der Emmentalerkäseemilch. *XVI Int Dairy Congr C*, 377-382
- Langsrud T, Reinbold GW (1973) Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review. I. Milk qualities and treatments. *J Milk Food Technol* 36, 487-490
- Madec MN, Rouault A, Maubois JL (1993) Milieu sélectif et procédé pour le dénombrement des bactéries propioniques. Brevet Fr n°dépot 93 008 23
- Madec MN, Rouault A, Maubois JL, Thierry A (1994) Milieu sélectif pour le dénombrement des bactéries propioniques. Brevet européen n° dépot PCT/FR94 000 82
- Mundt JO (1986) Enterococci. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath PH, Mair NS, Sharpe HE, Holt JG, eds). The Williams and Wilkins Company, Baltimore, vol 2, 1063-1065
- Peberdy MF, Fryer TF (1976) Improved selective media for the enumeration of propionibacteria from cheese. *NZ J Dairy Sci Technol* 11, 10-15
- Sanz Perez B, Lopez Lorenzo P, Garcia ML, Hernandez PE, Ordonez JA (1982) Heat resistance of enterococci. *Milchwissenschaft* 37, 724-726
- Sharpe ME (1962) Enumeration and studies of *Lactobacilli* in food products. *Dairy Sci Abstr* 24, 165-171
- Steffen C, Flueckiger E, Bosset JO, Ruegg M (1986) Swiss-type varieties. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Major cheese groups*, vol 2 (Fox PF ed). Elsevier, London, 93-120
- Tomes NJ, Henderick CA, Glatz BA (1991) Selective medium for *Propionibacterium* growth. *US Pat n° 5 026 647*
- Trouvé E, Maubois JL, Piot M, Madec MN, Fauquant J, Rouault A, Tabard J, Brinkman G (1991) Rétenion de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. *Lait* 71, 1-13
- Turner KW, Morris HA, Martley FG (1983) Swiss-type cheese. II. The role of thermophilic lactobacilli in sugar fermentation. *NZ J Dairy Sci Technol* 18, 117-123
- Zanoni P, Farrow JAE, Phillips BA, Collins MD (1987) *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson and Anderson) sp nov, nom rev. *Int J Syst Bacteriol* 37, 339-341