

Article original

Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycérol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture

V Huchet, D Thuault, CM Bourgeois

ADRIA, 6, rue de l'Université, 29334 Quimper Cedex, France

(Reçu le 10 février 1995; accepté le 18 mai 1995)

Résumé — Pour prévoir le comportement de *Clostridium tyrobutyricum* dans les fromages, la modélisation de l'influence des facteurs affectant la germination des spores et la croissance du micro-organisme est nécessaire. L'étude de la croissance des cellules végétatives a été réalisée dans une gamme de conditions réalistes par rapport à la fabrication de l'emmental (pH 5,3 à 5,9, NaCl 0 à 0,6%, acide lactique 0 à 1,6%, glycérol 0 à 8% pour avoir des a_w comprises entre 0,965 et 0,99) et le recueil des données a été effectué selon un plan centré composite de manière à étudier les effets linéaires, les effets quadratiques et les interactions entre facteurs. Les paramètres de croissance de la souche CNRZ 500 ont été déterminés directement à partir des courbes turbidimétriques et les résultats obtenus montrent que même dans des gammes de variation aussi réduites, la croissance de *C. tyrobutyricum* est sensible aux variations de chacun de ces facteurs et à l'interaction lactate-NaCl. Grâce à ces données, un premier modèle a été établi.

***Clostridium tyrobutyricum* / modélisation de la croissance / milieu de culture / fromage**

Summary — Development of a model predicting the effects of pH, lactic acid, glycerol and sodium chloride content on the growth of vegetative cells of *Clostridium tyrobutyricum* in a culture medium. In order to be able to predict the behaviour of *C. tyrobutyricum* in cheeses, the modelling of the parameters of the spore germination and of cell multiplication is necessary. The study of this multiplication was carried out in conditions encompassing those encountered in Emmental cheesemaking (pH 5.3 to 5.9; chloride sodium content 0 to 0.6%; lactic acid concentration 0 to 1.6%; glycerol 0 to 8% in order to obtain water activities between 0.965 to 0.99). The data recording was made following a composite central design in order to study the linear and quadratic effects and the interactions between the controlling factors. The growth parameters of strain CNRZ 500 were directly determined using the turbidimetric data and the results obtained show that even in such a limited variation range, *C. tyrobutyricum* is sensitive to any change of the factors and to the interaction between the lactic acid and sodium chloride contents. As a result of these data, a first model has been established.

***Clostridium tyrobutyricum* / modelling of the growth / cheese / culture medium**

INTRODUCTION

La fermentation butyrique associée à un gonflement est un accident redouté de l'affinage des fromages (notamment des pâtes pressées cuites de type emmental), qui se manifeste quelques semaines à quelques mois après la fabrication.

Il est généralement admis que l'apparition du défaut est liée à la prolifération d'un micro-organisme sporulé, un *Clostridium* du groupe butyrique, *C tyrobutyricum* (Bergère et Hermier, 1970). Ce germe mésophile métabolise le lactate au-dessus de pH 5,3 en présence d'acétate. Dans ces conditions, il y a production d'acide butyrique, d'acide acétique, de gaz carbonique et d'hydrogène, ces derniers provoquant le gonflement (Roux et Bergère, 1977).

Pour prévenir ce défaut butyrique, divers travaux ont été menés ou sont en cours :

- sur la réduction du nombre de spores dans le lait par des moyens physiques tels que l'écémage ou la bactofugation (ITG, 1984) ;
- sur la détection rapide des spores de *C tyrobutyricum* (Abgrall et Bourgeois, 1985) ;
- sur l'inhibition des cellules de *C tyrobutyricum* par des substances telles que le lysozyme (Bester et Lombard, 1990), les nitrites (Stadhouders, 1990) ou les bactériocines produites par les bactéries lactiques (Thuault *et al*, 1991).

Des recherches concernant l'influence du pH, du NaCl et de l'acide lactique sur la croissance de *C tyrobutyricum* ont déjà été effectuées (Galesloot, 1964 ; Pulay, 1974 ; Perfiliev, 1980 ; Kleter *et al*, 1982) mais divers faits d'observation, notamment l'irrégularité des résultats d'inoculations expérimentales suggèrent que les conditions d'apparition du défaut sont encore mal connues. Une modélisation de l'influence des facteurs affectant la croissance du micro-organisme et de leurs inter-

actions pourrait donc s'avérer utile. C'est l'objet de ce travail ; toutefois, étant donné la difficulté de modéliser la germination et la croissance de spores, l'objectif des travaux décrits est limité à la modélisation de la croissance des cellules végétatives, une étude ultérieure devant s'efforcer de modéliser la germination ou l'ensemble germination-croissance.

Cette modélisation a nécessité de tracer un grand nombre de courbes de croissance correspondant chacune à des valeurs définies des facteurs étudiés (pH, lactate, glycérol, NaCl), conformément à un plan d'expérience également défini. Étant donné le nombre de combinaisons à étudier, le recueil des données a été réalisé par turbidimétrie en utilisant un appareil automatique Bioscreen (Roberts, 1990).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches utilisées

Souche isolée d'ensilage : CNRZ 608.

Souches isolées de fromages gonflés : CNRZ 500 CNRZ 510 CNRZ 596.

Milieu

Le milieu de base est un milieu RCM (Merck, 5411) auquel sont ajoutés de l'acide lactique et du NaCl. L'activité de l'eau est calculée pour chaque milieu en fonction des concentrations en lactate et en NaCl ; elle est ensuite modulée avec du glycérol pour obtenir des a_w comprises entre 0,965 et 0,99. La modélisation s'est faite en fonction de la concentration en glycérol et non de l' a_w , parce que le glycérol est un facteur indépendant des autres facteurs, alors que l' a_w dépend à la fois des concentrations en NaCl, lactate et glycérol. Le pH du milieu est ajusté grâce à NaOH 3N et tamponné par du tampon MES (4-Morpholinethansulfonsäure (Sigma, M2850)) avant stérilisation à 121°C pendant 15 min.

Inoculum

Du milieu RCM est inoculé à 1% à partir d'une suspension de spores et incubé. Cette culture est repiquée chaque jour pendant 3 jours (2 fois le 3^e jour). Toutes les cultures sont réalisées à 37°C. Par ce protocole, on obtient alors plus de 90% de cellules végétatives.

La suspension obtenue le dernier jour après 24 h d'incubation (approximativement 10⁹ cellules/ml) est diluée en deux étapes dans du milieu tryptone-sel (8,5 g/l de NaCl, 1 g/l de tryptone) pour obtenir une concentration finale de 4 10⁶ cellules/ml, c'est-à-dire un taux d'inoculation juste supérieur au seuil de détection du turbidimètre Bioscreen C.

Procédure expérimentale

Les cultures destinées au recueil des données nécessaires à la modélisation sont réalisées dans les cupules de 400 µl des plaques d'un turbidimètre automatique Bioscreen.

Pour créer l'anaérobiose dans les cupules du Bioscreen, des substances réductrices sont ajoutées au milieu. À 2,15 ml de milieu stérilisé sont ajoutés 0,05 ml d'Oxyrase (Oxyrase, Inc, PO Box 1345, Mansfield, États-Unis), 0,1 ml de succinate de sodium à 75 mmol/l et 0,1 ml de thiosulfate de sodium à 30 mmol/l, ces 2 derniers produits ayant été stérilisés par filtration (filtres Millipore 0,2 µm).

Tableau I. Combinaisons codées des 4 facteurs selon un plan centré composite et valeurs des taux de croissance μ et des taux de latence λ obtenues pour chaque combinaison.

Coded combinations of the 4 factors according to a central composite design and values for μ and λ obtained for each combination.

Points	Facteurs				μ (0,01 h ⁻¹)		λ (h)	
	pH	Lactate	NaCl	Glycérol				
1	-1	-1	-1	-1	4	3,9	11	11,5
2	-1	-1	1	-1	3,7	3,2	12	12
3	-1	1	-1	-1	3,2	3,1	13,5	13
4	-1	1	1	-1	2,3	2,5	15,7	15,5
5	-1	-1	-1	1	3,5	3,6	13,5	12,4
6	-1	-1	1	1	4	3,8	13,7	15,7
7	-1	1	-1	1	2,7	2,7	16,5	16
8	-1	1	1	1	2,1	1,7	19	20
9	1	-1	-1	-1	3,8	3,8	5,2	5,8
10	1	-1	1	-1	3,9	3,9	6,4	5,7
11	1	1	-1	-1	2,9	3,2	6	6
12	1	1	1	-1	3,2	3,1	7,2	6,4
13	1	-1	-1	1	3,1	3,7	3,5	7,7
14	1	-1	1	1	3,4	3,7	7,7	7,6
15	1	1	-1	1	2,6	3,2	8,2	10
16	1	1	1	1	2,5	2,2	12,7	11,2
17	0	0	0	2	3,2	2,9	20,8	19,5
18	0	0	0	-2	3,3	3,2	9,5	8
19	0	0	2	0	2,2	2,6	30	17
20	0	0	-2	0	2,9	2,8	17	10
21	0	2	0	0	2,5	2,6	25	33
22	0	-2	0	0	3,7	3,5	8,4	7,5
23	2	0	0	0	3,1	3	11,7	13,2
24	-2	0	0	0	2,3	2,5	18,5	14
25	0	0	0	0	3,1	3,1	14	12,5

Ce mélange inoculé par 0,1 ml de la suspension bactérienne est distribué dans les cupules à raison de 350 μ l par cupule. Le contenu de chaque cupule est ensuite recouvert par 3 gouttes d'huile de paraffine et un film auto-adhésif est collé sur la plaque pour empêcher tout renouvellement d'oxygène. La plaque est ensuite placée dans l'incubateur du Bioscreen à 24°C et les densités optiques sont relevées toutes les 20 min.

Plan d'expérience

Pour déterminer les effets linéaires, les effets quadratiques et les interactions entre facteurs, le choix s'est porté sur un plan centré composite (4 facteurs, 5 niveaux). Celui-ci est composé d'un plan factoriel 2^k pour déterminer les facteurs significatifs, puis de points étoiles et centraux pour optimiser la réponse. Le plan centré composite comporte ($2^k + 2k + 1$) combinaisons où k correspond au nombre de facteurs. À chacun des niveaux des différents facteurs sont attribués, pour faciliter l'analyse statistique, les codes suivants : $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , α . α étant égal à $4\sqrt{2^k}$; dans notre cas, pour 4 facteurs, $\alpha = 2$ (Box *et al*, 1978) (tableau I). À ces différents symboles : -2 , -1 , 0 , 1 , 2 correspondent les valeurs à tester des 4 facteurs (tableau II).

RÉSULTATS

Choix de la souche

Pour ne pas sous-estimer le risque de développement de *C tyrobutyricum* dans le fro-

mage, il faut choisir parmi les souches disponibles celle possédant le taux de croissance le plus élevé.

Pour choisir cette souche, un milieu témoin (RCM) et un milieu RCM modifié (pH 5,8 ; acide lactique 1% ; NaCl 0,2%) ont été inoculés avec l'une des 4 souches suivantes de *C tyrobutyricum* : CNRZ 500, CNRZ 510, CNRZ 596, CNRZ 608. Chaque expérience a été répétée 10 fois et la figure 1 représente l'analyse statistique des taux de croissance des différentes souches. Au vu des résultats, la souche présentant le meilleur taux de croissance dans le milieu modifié est la souche CNRZ 500 (fig 1) qui a donc été utilisée pour la modélisation.

Modélisation

L'expérience correspondant à chaque point du plan expérimental a été réalisée 2 fois. Pour chacune, la courbe Log DO = $f(\text{tps})$ a été tracée grâce au logiciel Excel ; le taux de croissance μ et le temps de latence λ ont été déterminés graphiquement.

Le tableau I indique les valeurs ainsi obtenues du taux de croissance et du temps de latence pour chaque combinaison pH, lactate, glycérol, NaCl. Ces données ont été traitées informatiquement par le logiciel Statgraphics et une analyse de variance a été effectuée (tableau III).

Tableau II. Valeurs attribuées aux différents facteurs.
Values of the different factors.

	A lactique % v/v	NaCl % m/v	pH	Glycérol % m/v
-2	0,6	0	5,3	0
-1	0,85	0,15	5,45	2
0	1,1	0,3	5,6	4
1	1,35	0,45	5,75	6
2	1,6	0,6	5,9	8

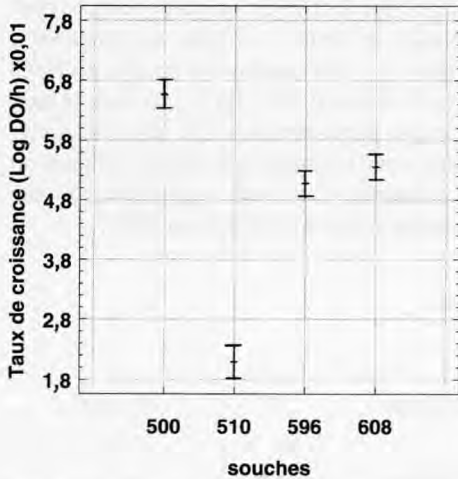


Fig 1. Taux de croissance des différentes souches sur milieu modifié (pH : 5,8, NaCl : 0,2%, acide lactique : 1%) avec $P < 0,05$.

Growth rate of the different strains on modified medium (pH: 5.8, NaCl: 0.2%, lactic acid: 1%) with $P < 0.05$.

L'analyse de variance porte sur 14 facteurs ; donc le modèle initial est une équation à 14 termes :

$$\begin{aligned} \mu = & -0,749 + (0,306 \times \text{pH}) - (0,137 \times \text{lactate}) - (0,188 \times \text{NaCl}) + (0,10 \times \text{glycérol}) + \\ & (0,024 \times \text{pH} \times \text{lactate}) + (0,043 \times \text{pH} \times \text{NaCl}) - (0,002 \times \text{pH} \times \text{glycérol}) \\ & - (0,034 \times \text{lactate} \times \text{NaCl}) - (0,001 \times \text{lactate} \times \text{glycérol}) - (0,001 \times \text{NaCl} \times \text{glycérol}) - \\ & (0,029 \times \text{pH}^2) + (0,001 \times \text{lactate}^2) - (0,042 \times \text{NaCl}^2) + (0,0001 \times \text{glycérol}^2) \end{aligned}$$

avec :

- μ exprimé en $\Delta \text{Log DO/h}$;
- acide lactique en % v/v ;
- NaCl en % m/v ;
- glycérol en % v/v ;
- pH en unités pH.

Mais pour affiner le modèle, seuls sont pris en compte les facteurs à effets significatifs (tableau IV). Les autres sont supprimés un à un de manière à détecter l'éven-

tuelle apparition d'un nouveau facteur significatif engendré par la modification du modèle.

On obtient alors 6 facteurs à effets significatifs sur le taux de croissance avec les coefficients de régression suivants :

- constante : $1,5 \cdot 10^{-3}$
- A : $6,7 \cdot 10^{-3}$;
- B : $-6,0 \cdot 10^{-3}$
- C : $5,23 \cdot 10^{-2}$
- D : $-6 \cdot 10^{-4}$
- BC : $-3,42 \cdot 10^{-2}$
- CC : $-3,70 \cdot 10^{-2}$.

Le modèle simplifié est donc :

$$\begin{aligned} \mu = & 0,0015 + (0,0067 \times \text{pH}) - (0,0060 \times \text{acide lactique}) + (0,0523 \times \text{NaCl}) \\ & - (0,0006 \times \text{glycérol}) \\ & - (0,0342 \times \text{NaCl} \times \text{acide lactique}) - (0,0370 \times \text{NaCl}^2) \end{aligned}$$

La même démarche a été adoptée pour le temps de latence et le modèle simplifié obtenu est :

$$\begin{aligned} \lambda = & 2112,1 - (734,5 \times \text{pH}) + (8,9 \times \text{acide lactique}) - (1,2 \times \text{glycérol}) \\ & + (63,9 \times \text{pH}^2) + (0,3 \times \text{glycérol}^2) \end{aligned}$$

Ce dernier modèle qui exprime le temps de latence des cellules végétatives mises en culture dans les conditions expérimentales choisies n'a en fait que peu d'intérêt car dans la réalité ce qui importe, c'est le temps de germination des spores, qui sera étudié ultérieurement.

En ce qui concerne le taux de croissance, le tableau IV indique que 4 termes linéaires (pH, lactate, glycérol, NaCl), 1 terme quadratique (NaCl^2) et 1 interaction (lactate-NaCl) sont significatifs ; les valeurs du test F nous révèlent de plus que le lactate est le facteur prépondérant parmi ceux étudiés.

Ces modèles peuvent être transcrits sous forme de surfaces de réponses. Les figures 2 à 7 représentent en 3 dimensions les

effets du NaCl, pH, lactate, glycérol sur le taux de croissance : dans chaque cas on fait varier 2 facteurs, les autres étant maintenus à leur valeur centrale.

On peut voir que le taux de croissance s'accroît avec l'augmentation du pH (figs 2 et 5) alors qu'il diminue avec l'augmentation des concentrations en lactate et en gly-

cérol (figs 2 et 3). En ce qui concerne l'effet NaCl, on obtient un taux de croissance maximal pour une concentration en NaCl de l'ordre de 0,18% (fig 5) ; au-delà, le taux de croissance diminue. Cet effet NaCl interagit avec l'effet lactate (fig 6) : le taux de croissance chute avec l'augmentation des concentrations de lactate et NaCl.

Tableau III. Analyse de variance du taux de croissance.
Variance analysis for the growth rate.

Facteur	SCE	ddl	Variance	F	niv sign
A:pH	5,14 E-5	1	5,14 E-5	4,8	4,13 *
B:lactate	8,29 E-4	1	8,29 E-4	77,47	4,13 *
C:NaCl	6,29 E-5	1	6,29 E-5	5,88	4,13 *
D:glycerol	7,56 E-5	1	7,56 E-5	7,06	4,13 *
AB	2,63 E-5	1	2,63 E-5	2,46	4,13
AC	3,00 E-5	1	3,00 E-5	2,8	4,13
AD	9,03 E-6	1	9,03 E-6	0,84	4,13
BC	5,25 E-5	1	5,25 E-5	4,9	4,13 *
BD	1,95 E-5	1	1,95 E-5	1,82	4,13
CD	7,80 E-7	1	7,80 E-7	0,07	4,13
AA	1,20 E-5	1	1,20 E-5	1,12	4,13
BB	8,00 E-8	1	8,00 E-8	0,007	4,13
CC	2,41 E-5	1	2,41 E-5	2,25	4,13
DD	1,33 E-6	1	1,33 E-6	1,24	4,13
Erreur totale	3,42 E-4	35	1,07 E-7		

Seuil de signification: * $P < 0,05$.

Tableau IV. Analyse de variance après élimination des facteurs non significatifs à 95%.
Variance analysis after elimination of the non significant factors at 95%.

Facteur	SCE	ddl	Variance	F	niv sign
A:pH	5,10 E-5	1	5,10 E-5	4,72	4,05 *
B:lactate	8,29 E-4	1	8,29 E-4	76,76	4,05 **
C:NaCl	6,29 E-5	1	6,29 E-5	5,82	4,05 *
D:glycerol	7,56 E-5	1	7,56 E-5	7	4,05 *
BC	5,25 E-5	1	5,25 E-5	4,86	4,05 *
CC	4,37 E-5	1	4,37 E-5	4,05	4,05 *
Erreur totale	4,65 E-4	43	1,08 E-5		

Seuil de signification: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

DISCUSSION

La méthode utilisée dans cette étude consistant à déterminer les paramètres de croissance directement à partir des courbes turbidimétriques a été motivée par un souci de simplicité. Elle évite d'avoir à convertir les densités optiques en concentrations cellulaires avec tous les problèmes qu'elle pose, notamment le fait que la relation concentration cellulaire = $f(\text{DO})$ varie suivant la composition du milieu. Toutefois, on reproche souvent à cette méthode que la zone délimitée pour calculer le taux de croissance est arbitraire et que la valeur obtenue n'est pas forcément le taux de croissance maximal. Mais, selon Breidt *et al* (1994) la détermination du taux de croissance n'est imprécise que lorsque le coefficient de détermination R^2 est inférieur à 0,90 ; or dans cette étude, R^2 est supérieur à 0,98 pour chacune des courbes ; le taux de croissance obtenu peut donc être considéré comme une bonne estimation du μ max.

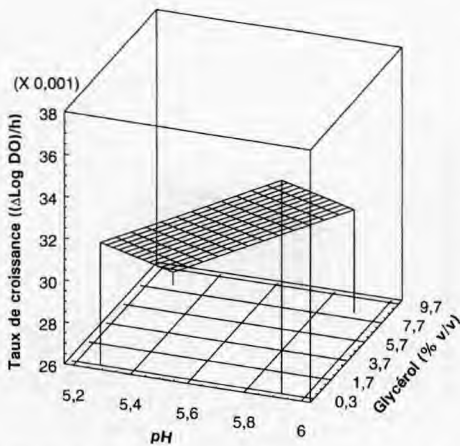


Fig 2. Surface de réponse montrant les effets du pH et du glycérol (avec NaCl : 0,3%, lactate : 1,1% et T° : 24°C) sur la croissance de *C tyrobutyricum*.

Response surface showing the effect of pH and glycerol (with NaCl: 0.3%, lactate: 1.1% and T° : 24°C) on the growth of *C tyrobutyricum*.

L'effet des facteurs physico-chimiques sur la croissance de *C tyrobutyricum* a été assez peu étudié. Galesloot (1964) a mis en évidence que plus le pH augmente, plus la quantité de sel doit être importante pour

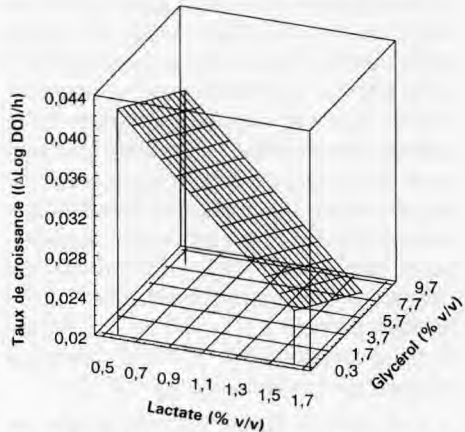


Fig 3. Surface de réponse montrant les effets du lactate et du glycérol (avec NaCl : 0,3%, pH : 5,6 et T° : 24°C) sur la croissance de *C tyrobutyricum*.

Response surface showing the effect of lactate and glycerol (with NaCl: 0.3%, pH: 5.6 and T° : 24°C) on the growth of *C tyrobutyricum*.

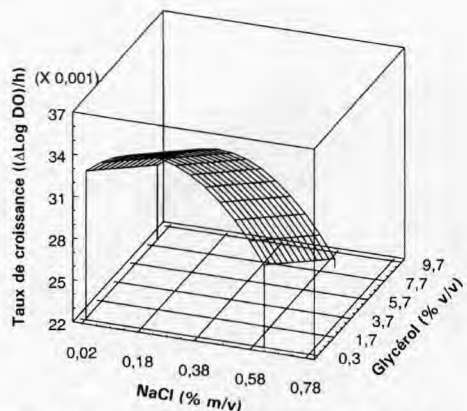


Fig 4. Effets du NaCl et du glycérol (avec pH : 5,6, lactate : 1,1% et T° : 24°C) sur la croissance de *C tyrobutyricum*.

Effects of NaCl and glycerol (with pH: 5.6, lactate 1.1% and T° : 24°C) on the growth of *C tyrobutyricum*.

inhiber la fermentation butyrique. Cela est confirmé par Kleter *et al* (1982) qui, étudiant l'influence du pH et du NaCl sur la croissance de *C tyrobutyricum* dans le lactosérum, ont trouvé que 2% de NaCl prévient la croissance à pH 4,9 mais qu'à pH 6 la croissance se manifeste jusqu'à 6% de NaCl. Quand à Perfiliev (1980), il a étudié l'effet du pH entre 4,5 et 8 et l'effet du NaCl entre 2 et 6% ; dans cette gamme, une diminution du pH et une augmentation de la concentration en NaCl entraînent une augmentation du temps de latence et une diminution du taux de croissance comme dans notre étude. En ce qui concerne l'acide lactique, Kleter *et al* (1982) ont montré une interaction acide lactique-pH : 2% d'acide lactique associé à pH < 4,8 ou 4% d'acide lactique associé à pH < 5,1–5,2 prévient la croissance pendant 40 jours à 30°C.

Les auteurs précédents ont étudié les facteurs considérés dans des intervalles de variation plus larges que ceux observés dans la pratique industrielle. Notre expérimentation, au contraire, était ciblée sur les intervalles de variation de la fabrication de l'emmental, tirés de la littérature (Berdagué

et Grappin, 1989 ; Delacroix-Buchet et Trosat, 1991), et visait à déterminer si dans des intervalles aussi restreints, les facteurs considérés influaient sensiblement sur la croissance. Les résultats obtenus montrent que même dans des gammes de variation

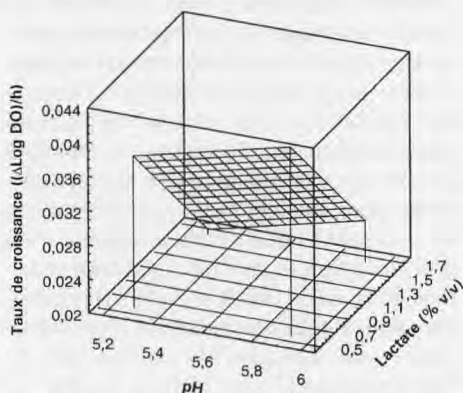


Fig 6. Effets du lactate et du NaCl (avec glycérol : 4%, pH : 5,6 et T° : 24°C) sur la croissance de *C tyrobutyricum*.

Effects of lactate and NaCl (with glycerol:4%, pH: 5.6 and T°: 24°C) on the growth of *C tyrobutyricum*.

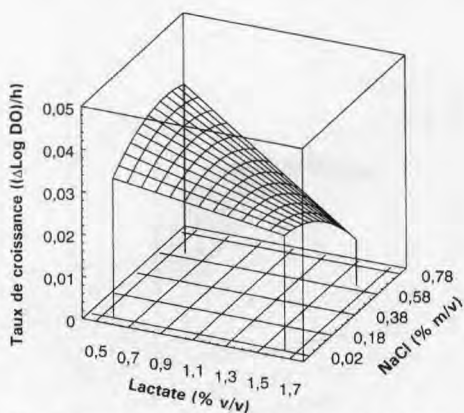


Fig 5. Effets du pH et du NaCl (avec lactate : 1,1%, glycérol : 4% et T° : 24°C) sur la croissance de *C tyrobutyricum*.

Effects of pH and NaCl (with lactate: 1.1%, glycerol: 4% and T°: 24°C) on the growth of *C tyrobutyricum*.

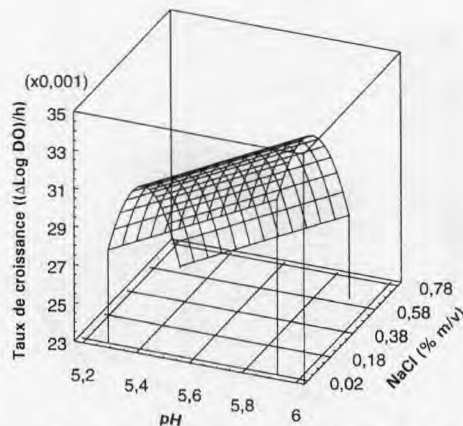


Fig 7. Effets du pH et du lactate (avec glycérol : 4%, NaCl : 0,3% et T° : 24°C) sur la croissance de *C tyrobutyricum*.

Effects of pH and lactate (with glycerol: 4%, NaCl: 0.3% and T°: 24°C) on the growth of *C tyrobutyricum*.

aussi réduites (pH 5,3 à 5,9, NaCl 0 à 0,6%, acide lactique 0,6 à 1,6%, glycérol 0 à 8% modulant l' a_w de 0,965 à 0,99) la croissance de *C. tyrobutyricum* est sensible aux variations de chacun de ces facteurs et à l'interaction lactate-NaCl. Ces résultats sont en accord avec l'importance de la concentration en NaCl mise en évidence dans les fromages, le facteur limitant de la croissance étant la vitesse de pénétration du sel. Le lactate qui a une grande influence sur la croissance de *C. tyrobutyricum* pourrait jouer un rôle déterminant en début d'affinage, relayé ensuite par le NaCl lorsque la concentration en lactate diminue du fait de sa consommation par les bactéries propioniques. Il en résulte que l'irrégularité, constatée par ailleurs, des effets d'inoculations expérimentales en fromagerie pourrait s'expliquer par des variations de composition chimique du caillé.

En conclusion, cette étude réalisée dans une gamme de conditions réalistes par rapport à la pratique industrielle est une première approche de la modélisation de la croissance de *C. tyrobutyricum*. Elle a permis de mettre en évidence l'effet des 4 facteurs (pH, NaCl, lactate, glycérol) sur la vitesse de croissance de *C. tyrobutyricum*. Cette étude se poursuivra par la modélisation de la germination et celle de la croissance à partir des spores, puis par l'essai de validation des modèles.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient JJ Cleret pour ses conseils pour les analyses statistiques.

RÉFÉRENCES

Abgrall B, Bourgeois C (1985) Dénombrement de spores de *Clostridium tyrobutyricum* par filtration

sur membrane et culture sur milieu gélosé. *Lait* 65, 45-53

Berdagué JL, Grappin R (1989) Affinage et qualité du gruyère de Comté. *Lait* 69, 183-196

Berdagué JL, Grappin R, Delacroix-Buchet A, Chaillet B (1990) Caractérisation de l'emmental grand cru français. Composition physico-chimique. *Lait* 70, 1-14

Bergère JL, Hermier J (1970) Spore properties of clostridia occurring in cheese. *J Appl Bacteriol* 33, 167-169

Bester BH, Lombard SH (1990) Influence of lysozyme on selected bacteria associated with Gouda cheese. *J Food Prot* 53, 306-311

Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1978) Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building. John Wiley & Sons, New York

Breidt F, Romick TL, Fleming HP (1994) A rapid method for the determination of bacterial growth kinetics. *J Rapid Methods Autom Microbiol* 3, 59-68

Delacroix-Buchet A, Trossat P (1991) Protéolyse et texture des fromages à pâte pressée. I. Influence de l'activité de l'eau. *Lait* 72, 299-312

Galesloot (1964) Some factors affecting the efficiency of nitrate in controlling the butyric acid fermentation in Edam and Gouda cheese. *Neth Milk Dairy J* 18, 127-138

ITG (1984) La bactofugation du lait, expérimentations avec le traitement à température moyenne. Deuxième partie. Étude ZS 84/2/b 29 p

Kleter G, Lammers WL, Vos EA (1982) The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *C. tyrobutyricum* in whey and cheese. Experiments in whey. *Neth Milk Dairy J* 36, 79-87

Perfiliev GD (1980) Effect of pH, temperature, cooking salt concentration and water activity on development of anaerobic sporeformers causing cheese spoilage. *Povyshenie effektivnosti i katestva v syrodellii* G 105, 62-67

Pulay G (1974) Neues über einige die Lebenstätigkeit der Buttersäurebakterien beeinflussende Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der Haltbarkeit von Schmelzkäsen. *Dtsch Molk Ztg* 95, 8-16

Roberts (1990) Predicting modelling of microbial growth. *Food Technol Int Eur* 231-233

Roux C, Bergère JL (1977) Caractères taxonomiques de *C. tyrobutyricum*. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 128 A, 267-276

Stadhouders J (1990) Prevention of butyric acid fermentation by the use of nitrate. *Bull Int Dairy Fed* 251, 41-46

Thuault D, Beliard E, Le Guern J, Bourgeois CM (1991) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 74, 2-10