Mise au point d'une méthode de mesure de la concentration totale en cellules de *Brevibacterium linens* à la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée

A Oumer, MN Leclercq-Perlat, JL Bergère, G Corrieu

Laboratoire de génie et de microbiologie des procédés alimentaires,
Inra, 78850 Thiverval-Grignon, France

(Reçu le 16 novembre 1995 ; accepté le 13 mars 1996)

Résumé – Une méthode de mesure de la concentration totale en cellules de *Brevibacterium linens* ATCC 9175 en surface d'un fromage est développée. Dans un premier temps, la mise au point de cette méthode est réalisée dans un milieu liquide, puis, appliquée au cas du fromage. Cette méthode est fondée sur la solubilisation des pigments cellulaires par le méthanol. Les meilleures conditions d'extraction correspondent à une incubation de 1 h à 25 °C à partir du culot cellulaire provenant d'une culture en milieu liquide. En présence de fromage, il est nécessaire d'éliminer au préalable les matières grasses solubilisées par le méthanol en laissant l'extraire méthanolique 1 h à 4 °C. Une mesure d'absorbance à 450 nm détermine le niveau de pigmentation. La pigmentation de *B. linens* ATCC 9175 est indépendante de la lumière, de la concentration en chlorure de sodium et du milieu de culture utilisé (liquide ou fromage). Dans le cas de cultures en milieu liquide de composition proche de celle d'un caillé, les mesures d'absorbance à 450 nm traduisant la quantité de pigments sont comparées aux résultats obtenus par d'autres méthodes de mesure de la concentration cellulaire totale (quantité de matière sèche et absorbance à 650 nm). Bien que les corrélations linéaires entre quantité de matière sèche et quantité de pigments soient tout à fait correctes pour un essai donné, elles ne sont pas généralisables et de ce fait ne peuvent être utilisées. En revanche, la corrélation entre absorbance à 650 nm et quantité de pigments a une linéarité satisfaisante ($R^2 \geq 0,90$) et est indépendante de l'essai considéré. La mesure de la quantité de pigments par absorbance à 450 nm peut être utilisée comme moyen de détermination rapide de la concentration totale en cellules de *B. linens*, ATCC 9175, de fromages expérimentaux à flore d'affinage définie. Elle serait applicable à d'autres souches de *B. linens* dont la pigmentation est stable. Dans le cas de mélanges microbiens plus complexes, tels que ceux présents en surface des fromages industriels, cette méthode ne peut être utilisée que si les autres bactéries présentes ne sont pas pigmentées.

***Brevibacterium linens* / concentration cellulaire / quantité de pigments cellulaires / extraction méthanolique / fromage à pâte molle et croûte lavée**

Summary – Quantitative method for enumeration of *Brevibacterium linens* cells in bacterial surface-ripened cheese. A method for enumeration of *B. linens* cells ATCC 9175 in surface of bacterial surface-ripened cheese by estimation of pigment quantity was developed. In first time, this method was realized in liquid medium, after that applied in cheese. The cellular pigments of *B. linens*

were completely solubilized by methanol. The best conditions of solubility were 1 h at 25 °C from cell liquid culture. In cheese, it is necessary to eliminate the fat content by the methanol solution by standing it 1 h at 4 °C before filtration. The cellular pigmentation was measured by absorbance at 450 nm. Absorbance measure at 450 nm was equivalent to level of pigmentation. The pigmentation of *B. linens* ATCC 9175 was independent of light, of sodium chloride concentration and growth medium (liquid or cheese). In liquid medium with similar composition of curd, the cell dry weight matter and turbidimetric absorbance at 650 nm were chosen as reference methods. The dry weight method could not be used because the correlation established between pigment quantity and dry weight were different for each test. The correlation established between turbidimetric absorbance at 650 nm and pigment quantity was satisfying ($R^2 \geq 0.90$) and independent of the test considered. The pigment quantity method by absorbance at 450 nm could be used for rapid determination of total cell concentration of *B. linens* ATCC 9175 in experimental bacterial surface-ripened cheeses during ripening. This method would be applicable to stable pigmentation *B. linens* strains. In the case of microbial mixtures like that existing in the surface of industrial cheese, this pigment quantity method could be used only if the other bacteria did not produce pigments.

***Brevibacterium linens* / cellular concentration / cell pigment quantity / extraction by methanol / bacterial surface-ripened cheese**

INTRODUCTION

Selon Lenoir (1991), les fromages à pâte molle et à croûte lavée, comme tout produit alimentaire, doivent répondre aux deux exigences suivantes : hygiène et goût. Or, l'affinage de ces fromages est un phénomène complexe et dynamique. En effet, il est caractérisé par le développement en surface d'une flore microbienne composée d'une grande variété d'espèces appartenant à des groupes différents (moisissures, levures, bactéries). Ces groupes microbiens représentent des acteurs essentiels dans la détermination de la typicité des fromages (Lenoir et al, 1985). En effet, ils contribuent selon leur nature et suivant les caractéristiques du fromage à la détermination de la texture, de l'arôme et du goût du produit final. Ces micro-organismes possèdent des potentialités métaboliques variées, telles que, pour les levures, assimilation de l'acide lactique et du lactose, activités d'estérification et de dégradation de protéines et de peptides et activités lipolytiques, pour les bactéries activités protéolytiques allant jusqu'à la dégradation des acides aminés et activités lipolytiques (Lenoir et al, 1983). La population microbienne viable atteint généralement 10^9 à

10^{10} germes viables par gramme de croûte, parfois plus. Il est généralement admis qu'à partir d'un certain stade, elle évolue relativement peu au cours de l'affinage et qu'elle est affectée par une mortalité importante. Cependant, l'état physiologique et les activités biologiques de cette population sont mal connus. S'agit-il d'une population dont les cellules sont restées viables ou existe-t-il un renouvellement des cellules au fur et à mesure qu'une partie d'entre elles meurent ? En outre, l'équilibre entre les différentes espèces est sûrement en constante évolution. Il est fonction des particularités propres à chaque groupe microbien et de ce fait, dépend de facteurs physico-chimiques (a_w , pH, composition...), des conditions d'environnement (température, humidité relative, atmosphère...) et des interactions entre souches (coopération, inhibition...).

Afin d'améliorer la fabrication fromagère, il faut connaître et maîtriser les conditions physico-chimiques et microbiologiques de leur affinage. Cela nécessite une meilleure connaissance du comportement, du développement, de l'état physiologique et de l'activité biologique des populations mixtes de micro-organismes constituant la flore de surface. Pour étudier cela, nous avons

entrepris de fabriquer aseptiquement, à partir d'un lait microfiltré et pasteurisé, des fromages expérimentaux de type pâte molle-croûte lavée en limitant à deux le nombre de souches d'affinage (*Geotrichum candidum*, *Brevibacterium linens*). Cela implique de quantifier la concentration en cellules « viables » et « non viables » en différenciant chacune des deux espèces.

La concentration totale en levures (*G. candidum*, *Debaryomyces hansenii*...) à la surface des fromages est déterminée par une méthode de numération à l'aide d'un compteur de particules de type Coulter après élimination préalable des constituants du fromage par transpiration (Leclercq-Perlat et al, 1995). Les différentes espèces de levures présentes sont différenciables quand la différence de leur diamètre moyen est supérieure à 1 µm. Les cellules bactériennes de diamètre équivalent inférieur à 2 µm (ce qui est généralement le cas chez *B. linens*) ne peuvent être comptées avec ce type d'appareil car des particules de fromages, de diamètre inférieur ou égal à 1,8 µm, restent insolubles après transpiration.

En outre, après le traitement de transpiration, la mesure de la concentration bactérienne totale (viables et non viables) s'avère impossible quelle que soit la méthode utilisée : compteur Coulter, comptage direct des cellules au microscope, cytométrie de flux (Hadley et al, 1985) ou mesure optique (néphélométrie ou turbidimétrie) (Bourgeois et Mafart, 1991). En effet, la majorité des cellules bactériennes sont détruites par le réactif de transpiration (Driehuis et Teernstra, 1992) ou vidées de leur contenu cellulaire (Kouomegne et al, 1984). De plus, des constituants du réactif de transpiration peuvent pénétrer et/ou adhérer aux cellules (Miozzari et al, 1978).

Dagonneau (1979) a proposé d'évaluer la concentration cellulaire totale de cultures pures de *B. linens* en mesurant celle d'un hydrocarbure spécifique de leur enveloppe cellulaire par chromatographie en phase

gazeuse. Cependant, cet auteur montre que la concentration en hydrocarbure est difficilement corrélée à la biomasse totale obtenue par mesure du poids sec. Il explique cela par une trop faible concentration de l'hydrocarbure dans l'enveloppe cellulaire. De plus, l'application au cas des fromages s'est avérée impossible.

En revanche, le dosage des pigments orange de *B. linens* pourrait peut-être servir à mesurer, dans les fromages, la concentration totale en cellules de cette bactérie, y compris celles qui se sont lysées. La couleur jaune-orange de *B. linens* est relativement stable (Khol et al, 1983). Elle est en rapport avec le changement de couleur caractéristique de l'orange au rouge carmin des cellules de cette bactérie en présence d'alcali forts (Grecz et Dack, 1961 ; Jones et al, 1973). Selon Jones et al (1973), Fautz et Reinchenbach (1980) et Khol et al (1983), elle est due à des pigments se trouvant dans la membrane des cellules et appartenant à la famille des caroténoïdes. Dans le cas de la souche ATCC 9175, Khol et al (1983) ont montré l'existence et la structure de trois caroténoïdes de type aromatique responsables de la pigmentation des cellules et du changement caractéristique de couleur des colonies provoqué par les alcali forts.

Cependant, Mulder et al (1966) et Crombach (1974) ont constaté que certaines souches de *B. linens* ne se pigmentent pas si elles se développent à l'obscurité alors que d'autres sont insensibles à ce facteur. De plus, Grecz et Dack (1961), Mulder et al (1966) et Crombach (1974) ont observé que l'intensité de la couleur de *B. linens* est fonction de la souche considérée et, pour une même souche, de la composition du milieu de culture, en particulier de la concentration en NaCl et du pH. En dépit de ces variations, la réaction de coloration à la potasse (KOH, 5 N) a toujours lieu. Mais ces différents auteurs n'ont pas vérifié si ces facteurs avaient une influence sur la quantité de pigments produits.

L'étude des pigments se fait toujours après extraction à l'aide de solvants (méthanol, acétone, toluène) utilisés purs ou en mélange. Ainsi, pour extraire les pigments des cellules de *B. linens*, Jones et al (1973) utilisent le méthanol pur à 65 °C, Fautz et Reinchenbach (1980) utilisent un mélange acétone-toluène et plus récemment Khol et al (1983) préconisent l'emploi de méthanol pur à température ambiante.

L'objectif de notre travail est de mettre au point une méthode permettant de quantifier la concentration totale en *B. linens* à la surface d'un fromage, par mesure de la quantité de pigments des cellules. Il nous a paru utile de commencer l'étude en utilisant un milieu liquide (culture pure de *B. linens*) de composition se rapprochant à celle d'un caillé. Par la suite, nous appliquons cette méthode au fromage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches et conditions de culture

Souche utilisée

La souche de *B. linens* choisie, ATCC 9175, a été isolée du camembert et se pigmente aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Comme toutes les autres souches de cette espèce, elle tolère de fortes concentrations en sel (jusqu'à 15 %) (Crombach, 1974). Sa température optimale de croissance est de 25 °C et son pH optimal est voisin de la neutralité ou légèrement alcalin (Lecocq et Guéguen, 1994). En surface des fromages, les moisissures et/ou les levures comme *G. candidum* métabolisent le lactate et entraînent une remontée du pH du caillé, ce qui permet à *B. linens* de s'implanter (Boyaval et Desmazeaud, 1983). Les cellules de *B. linens* apparaissent après 10 à 15 jours d'affinage à 13 °C et 95 % d'humidité relative. Dans le cas de la souche ATCC 9175, elles sont opaques et de couleur orange.

Cultures en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide sont réalisées dans un bouillon de composition proche de celle du fromage. Soit, par litre d'eau : lactate de sodium (20 g ; Prolabo), extrait autolytique de levure

(5 g ; Biokar), peptone tryptique de caséine de type bio-tryptase (15 g ; Bio-Mérieux), chlorure de sodium (NaCl) (0 à 50 g ; Prolabo), potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4) (5 g ; Prolabo). Après autoclavage (121 °C, 20 min), les cultures sontensemencées à raison de 1 % avec une préculture de *B. linens* réalisée dans le même milieu et incubée sous une agitation à 25 °C pendant 36 h. Puis, les cultures sont incubées à 25 °C sous agitation de 250 tours/minute (agitateur LSL Biolafitte, France).

Chaque culture de *B. linens* est faite dans un erlenmeyer de 5 L contenant 2,5 L de milieu à pH 7 et 1 % de NaCl. Après autoclavage et ensemencement, la culture est incubée pendant 8 jours. Des prélèvements stériles de 60 mL sont effectués toutes les 4 heures pendant les 4 premiers jours d'incubation et puis toutes les 6 heures jusqu'au 8^e jour. Sur chaque prélèvement, sont réalisées les analyses suivantes : dénombrement en cellules viables, mesure de l'absorbance à 650 nm, mesure de la quantité de la matière sèche et mesure de la quantité de pigments. Chaque essai a été réalisé en double.

Cultures en surface des fromages

Dans ce cas, les fromages sont fabriqués aseptiquement dans une enceinte préalablement stérilisée et thermostatée à 30 °C. Le lait utilisé est un lait écrémé microfiltré (laboratoire de recherches de technologie laitière, Inra, Rennes). Il est reconstitué à 10 % et additionné de crème à 35 % de sorte que sa concentration en matière grasse soit égale à celle d'un lait entier. Après reconstitution, le lait est pasteurisé à 72 °C pendant 1 min 30 secondes. Il est ensuiteensemencé à 1 % par le levain lactique (*Lactococcus lactis* Prot* (souche 1128) et *Lactococcus lactis* Prot* (souche 1130)) et le levain d'affinage. Ce dernier est constitué de *B. linens* ATCC 9175 et de *G. candidum* G48 (collection du laboratoire de génie et de microbiologie des procédés alimentaires) qui a été isolée de la surface d'un Pont l'Évêque. Cette souche (G48) est classée dans la catégorie des *G. candidum* de type levuriforme par Guéguen (1984). Sa température optimale de croissance est de 22 °C à 25 °C et son pH optimal est voisin de 6. Guéguen (1984) montre également que comme toutes les souches de *G. candidum*, elle est sensible aux concentrations de sel supérieures à 5 % mais qu'elle est très peu sensible aux pH acides et relativement peu inhibée aux températures d'aff-

finage (8 °C-15 °C). En surface du fromage, elle se développe dès le 2^e jour d'affinage (8 à 12 °C, 95 % d'humidité relative) sous forme de cellules « ovoïdes » de couleur crème. De plus, Lecocq et Guéguen (1994) montrent que *B. linens* ATCC 9175 se développe normalement en présence de cette souche de *G. candidum*.

La présure à 52 mg/L de chymosine préalablement stérilisée par filtration est ajoutée à raison de 0,5 mL pour 200 mL de lait. Après caillage, moulage et égouttage, le fromage est salé en saumure saturée pendant 35 minutes. Après transfert aseptique dans une enceinte d'affinage stérile, les fromages sont ressuyés 24 heures à 80 % d'humidité relative à 13 °C. Ils sont ensuite affinés à 13 °C et à 95 % d'humidité relative pendant 60 jours.

Détermination de la biomasse et de la quantité de pigments des cultures de *B. linens*

Détermination de la concentration en cellules viables

Le dénombrement des cellules viables est effectué avec le milieu de Piton (1988) par la méthode des dilutions successives, avec ensemencement en surface des boîtes à l'aide d'un ensemeur spiral (Plater, Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France). Les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 25 °C pendant 3 à 5 jours.

Étude de la concentration totale des suspensions de *B. linens* en absence des fromages

Pour chaque prélèvement, la mesure de la quantité de matière sèche est réalisée par filtration de 10 mL de culture sur membrane en acétate de cellulose selon la procédure décrite par la norme Afnor V04-282 (1985).

La concentration totale des suspensions de *B. linens* est également déterminée par mesure de l'absorbance à 650 nm (Famelart et al, 1987). La relation absorbance-quantité de cellules est linéaire pour des absorbances comprises entre 0,3 et 0,7. Il en découle une légère imprécision pour les premières heures de croissance due aux faibles valeurs d'absorbance ($\leq 0,3$). Ensuite, si nécessaire, les cultures sont diluées avec de l'eau physiologique (9 g/L de NaCl) afin de rester dans cette plage et l'absorbance de la

culture est alors calculée en tenant compte du facteur de dilution.

Extraction et quantification optique des pigments

Pour les cultures en milieu liquide, la procédure d'extraction utilisée est schématisée sur la figure 1A. Elle est adaptée à partir de celles proposées par Yamaguchi (1957), Jones et al (1973), Fautz et Reinchenbach (1980) et Khol et al (1983). Cependant, contrairement à ces différents travaux, l'extraction des pigments de *B. linens* doit être quantitative. Des essais préliminaires (cultures en milieu liquide et sur fromage) ont montré que seule l'utilisation de méthanol pur (10 ou 20 mL/g pendant 1 h à 25 °C) permettait d'extraire la totalité des pigments se trouvant dans la membrane cellulaire. Les surnageants de culture et de lavage (fig 1A), de même que le résidu cellulaire restant sur le filtre après extraction, ne contiennent pas de pigments. En effet, ils ne se colorent plus en rouge-carmin en présence de potasse. Grecz et Dack (1961) et Crombach (1974) ont indiqué que l'intensité de la couleur des colonies de *B. linens* est fonction de la souche, du pH et de la concentration en NaCl. Pour la souche ATCC 9175, nous avons étudié les facteurs pH et concentration en NaCl. Ainsi la concentration en NaCl a varié de 0 à 5 % (milieu à pH 7,0). Pour étudier l'effet du pH, un milieu de concentration en NaCl égale à 1 % a été utilisé, en ajustant successivement son pH initial à des valeurs comprises entre 6 et 9,5. Dans tous les cas, les cultures de 50 mL sont réalisées en erlenmeyer de 250 mL et incubées pendant 48 heures. L'extrait méthanolique des pigments est alors analysé (spectrophotomètre Shimadzu UV 160) sur la plage d'absorbance 300-800 nm afin de déterminer la ou les longueurs d'onde à retenir pour la suite de l'étude.

Dans le cas des fromages fabriqués comme décrit précédemment, l'étude de la quantité de pigments est limitée à la surface. La croûte est prélevée selon la méthode proposée par Le Graet et Brûlé (1988). Elle est finement broyée à l'aide d'un pilon dans un mortier. Deux procédures d'extraction des pigments ont été comparées.

Premièrement, 0,5 ou 1 g d'échantillon finement broyé est mis en contact avec 40 mL d'une solution stérile de citrate à 2 % et ce mélange est homogénéisé à l'aide d'un broyeur Ultra-turrax (T25, Janke Kundel) à 20 500 tours/min pendant 2 minutes. La sus-

Fig 1. Protocole d'extraction des pigments cellulaires de *B. linens* ATCC 9175. **A.** Culture en milieu liquide. **B.** Culture en surface du fromage.

Extraction procedure of the cellular pigments of B. linens ATCC 9175. A. Culture in liquid medium. B. Culture in surface of cheese.

pension ainsi obtenue subit la procédure d'extraction décrite précédemment (fig 1B).

Deuxièmement, 0,5 ou 1 g d'échantillon finement broyé est directement mélangé à 10 mL de méthanol. Ce mélange est ensuite agité manuellement et l'extraction des pigments se fait également comme décrit sur la figure 1B. Par ailleurs, il est nécessaire de vérifier que si un constituant du fromage est solubilisé par le méthanol, il n'interfère pas sur les mesures d'absorbance de la quantité de pigments des cellules de *B. linens*. Pour cela, une culture de *B. linens*, réalisée en milieu liquide, est incubée 48 h à 25 °C sous agitation continue. Elle est ensuite centrifugée à 6000 g pendant 20 min afin de récupérer l'ensemble de la biomasse. Après lavage à l'eau et centrifugation (6000 g, 20 min), les cellules récupérées sont divisées en trois parties égales. La première (témoin) n'est pas mélangée au fromage, la seconde est mélangée à la suspension fromagère au citrate et la dernière est directement mélangée à 1 g de fromage finement broyé.

Le fromage utilisé est un fromage jeune de 2 jours nonensemencé par *B. linens*. Sur chaque partie, après extraction des pigments de *B. linens* au méthanol, les extraits méthanoliques sont analysés par absorbance entre 300 et 800 nm afin de définir les longueurs d'ondes les mieux adaptées à la quantification des pigments en présence ou en absence de fromage. Selon ce protocole, trois cultures différentes de *B. linens* ATCC 9175 sont testées. Pour chaque échantillon, la procédure d'extraction est réalisée en triple.

Afin de valider son application au cas des cultures de *B. linens* de surface des fromages, la méthode de dosage des pigments ainsi définie est utilisée pour suivre l'évolution de la concentration totale de *B. linens* ATCC 9175 au cours d'un affinage (durée 2 à 60 jours ; 95 % d'humidité relative ; 13 °C).

Étude statistique

Pour chaque culture de *B. linens* en milieu liquide, les corrélations entre les quantités de cellules mesurées par pesée et par absorbance à 650 nm et les quantités de pigments extraits sont définies afin de vérifier que cette mesure constitue une méthode acceptable de détermination de la concentration cellulaire totale.

La linéarité de la régression linéaire biomasse-pigmentation est appréciée par le calcul du coefficient de corrélation au carré (R^2). Un test de Fisher (F) est appliqué pour évaluer l'égalité des

régressions linéaires des différents essais (Vesereau, 1988). Ce test permet de comparer deux populations soumises à l'hypothèse suivante : égalité des régressions linéaires entre les différents essais. Chaque régression linéaire génère un modèle (indice i) caractérisé par la somme des écarts au carré (SS_i) et par son degré de liberté (dl_i). Pour cette hypothèse, la distribution F est calculée avec des degrés de liberté (dl_0, dl_i) pour le numérateur et dl_0 pour le dénominateur selon la relation 1 :

$$F = \frac{\left(\frac{SS_0 - \sum_{i=1}^n SS_i}{n} \right)}{\left(\frac{SS_0}{dl_0} \right)} \quad (1)$$

où dl_0 et SS_0 représentent respectivement le degré de liberté et la somme des écarts au carré des populations prises ensemble.

Les niveaux de confiance de 95 % et 99 % sont testés. L'hypothèse est acceptée si la distribution F calculée est plus petite que la valeur donnée dans les tables de Fisher-Snedecor pour le niveau de confiance de 95 % ou 99 % (Dagnelie, 1992). L'hypothèse est probablement erronée si la distribution F calculée est voisine des valeurs données dans les tables de Fisher-Snedecor à des niveaux de confiance de 99 % et de 95 %. L'hypothèse est considérée comme très certainement erronée dans les autres cas.

RÉSULTATS

Détermination de l'absorbance maximale, effet du pH et de la concentration en NaCl sur la pigmentation

Suspensions de *B. linens* en absence de fromage

Les différents spectres d'absorbance des extraits méthanoliques des pigments cellulaires présentent systématiquement deux pics d'absorbance importante : l'un mineur à 392 nm et l'autre majeur à 450 nm (fig 2). Les absorbances à l'une et l'autre de ces

deux longueurs d'onde pourraient servir pour apprécier la quantité de cellules. La longueur d'onde 450 nm est retenue pour la suite de l'étude. En outre, sachant que la totalité des pigments extraits par le méthanol est mesurée par absorbance à 450 nm, cette mesure est assimilée à la quantité de pigments produite par *B linens*.

Les essais réalisés afin d'étudier l'influence du pH et de la concentration en NaCl du milieu de culture sur l'absorbance permettent de conclure que ces facteurs n'ont pas d'influence. En effet, après extraction des pigments des cellules, les spectres d'absorbance des extraits méthanoliques présentent les mêmes pics caractéristiques, quelle que soit la concentration en NaCl utilisée ou quel que soit le pH initial du milieu. De plus, la croissance de *B linens* est maximale lorsque le pH initial est de 7,5 et nulle à un pH inférieur à 6,5 (résultat attendu). En revanche, aucune différence significative n'est mise en évidence quand la concentration en NaCl ajouté varie de 0 à 5 %, valeur en rapport avec celle existant dans la phase aqueuse d'un fromage.

Suspensions de *B linens* en présence de fromage

Dans le cas où le fromage est préalablement mis en suspension dans du citrate à 2 % avant d'être additionné d'une quantité connue de *B linens*, la solution obtenue après extraction des pigments n'est pas limpide. L'analyse de la quantité de pigments par absorbance s'avère impossible.

Dans le cas où le fromage est directement mélangé à une quantité connue de *B linens*, la solution obtenue après extraction des pigments au méthanol est parfaitement limpide. Cependant, lorsque la quantité de fromage utilisée est supérieure à 0,5 g pour 10 mL de méthanol, la totalité des pigments n'est pas extraite.

En effet, le culot est encore orange et réagit avec l'hydroxyde de potassium (KOH 5N) (Jones et al, 1973). Pour éviter cela, dans la suite de l'étude, l'extraction des pigments de *B linens* se fera sur 0,5 g de croûte pour 10 mL de méthanol. Dans ces conditions, les spectres d'absorption des extraits méthanoliques de *B linens* en

Fig 2. Spectre d'absorption des pigments extraits dans le méthanol.
Absorption spectra of pigment extract in methanol.

Tableau I. Résultats des tests statistiques relatifs aux régressions linéaires établies entre la quantité de pigments cellulaires et la concentration cellulaire totale mesurée par pesée ou par absorbance.

Statistical F-test applied to the linear regression established between the cellular pigment quantity and the total B linens concentration measured by dry weight or by absorbance at 650 nm.

Variable Y	Variable X		R^2	F	$dl_0 - \Sigma dl_i$	dl_0	Test-F	S
PS (g/L)	A 650	totalité de la culture	0,94	3,89	1	63	+	0,3
		phase de croissance	0,86	18	1	29	-	0,3
	A 450	totalité de la culture	0,86	11,3	1	62	-	0,2
		phase de croissance	0,70	37	1	29	-	0,1
A 650	A 450	totalité de la culture	0,90	2,1	1	63	++	0,3
		phase de croissance	0,88	6,50	1	30	+	0,01

PS : quantité de matière sèche (g/L), A 650 : absorbance à 650 nm, A 450 : quantité de pigments (absorbance à 450 nm), R : coefficient de corrélation, F : valeur du test de Fisher, dl_0 : degré de liberté de l'ensemble des cultures, dl_i : degré de liberté de la culture i, (++) : hypothèse acceptée à 95 %, (+) : hypothèse acceptée à 99 %, (-) : hypothèse rejetée, phase de croissance : temps de culture inférieur à 60 h, totalité de la culture : temps de culture égal à 150 h, S : seuil de détection exprimé en g/L ou en unité d'absorbance à 650 nm.

PS: dry matter quantity (g/L), A 650: absorbance at 650 nm, A 450: absorbance at 450 nm (pigment quantity), R: correlation coefficient, F: value of F-test, dl_0 : degree of freedom for all cultures, dl_i : degree of freedom for culture i, (++) : hypothesis accepted at the 95 %, (+): hypothesis accepted at the 99 %, (-): hypothesis rejected, growth's phase: culture time inferior to 60 h, culture's totality: culture time equal to 150 h, S: threshold of detection.

présence de fromage présentent deux pics à 410 nm et 450 nm (fig 2). Il y a sûrement interaction entre les pigments et la matière grasse pour le premier pic.

Par ailleurs, il est remarqué que la matière grasse des fromages solubilisée par le méthanol entraîne une surestimation de la quantité de pigments observée à 450 nm. Pour éviter cela, les extraits méthanoliques sont incubés à 4 °C pendant 1 heure avant de réaliser la filtration et la mesure de l'absorbance (fig 2).

Dans ces conditions, la quantité de pigments mesurée par absorbance à 450 nm en présence de fromage est identique, aux

erreurs près, à celles de l'échantillon témoin.

Par la suite, la quantité de pigments des cellules de *B linens*, quel que soit le milieu de culture utilisé, sera déterminée par une mesure d'absorbance à 450 nm.

Analyse de la croissance de *B linens* sur milieu liquide

Un exemple d'évolution de la quantité de matière sèche (PS), de la concentration en cellules viables (UFC), de l'absorbance à 650 nm et de la quantité de pigments (c'est-à-dire de l'absorbance à 450 nm) en

Fig 3. Exemple d'évolution de la quantité de matière sèche PS (g/L), de l'absorbance A 650 nm (A 650), de la concentration en cellules viables (UFC/mL) et de la quantité de pigments mesurée par absorbance A 450 nm (A 450) d'une culture de *B. linens* en fonction du temps d'incubation (25 °C, milieu liquide, agitation : 250 tours/min).

Evolution of dry matter PS (g/L), absorbance at 650 nm (A 650), viable cell concentration (UFC/mL) and pigment quantity measured by absorbance at 450 nm (A 450) of a culture of *B. linens* as a function of fermentation time (25 °C; liquid medium, agitation: 250 rpm).

Tableau II. Évolution de la concentration cellulaire totale de *B. linens* mesurée par absorbance à 450 nm en fonction de la durée d'affinage dans le cas d'un fromage expérimental.

Evolution of total cell concentration of *B. linens* obtained by absorbance at 450 nm in relation to ripening time for an experimental bacterial surface-ripened cheese.

Durée d'affinage (j)	Couleur observée, à l'œil nu	Absorbance à 450 nm	Bactéries viables (UFC/g de croûte)
2	blanc	0	$4,4 \cdot 10^6$
6	blanc	0	$6,5 \cdot 10^7$
14	blanc	0	$2,3 \cdot 10^7$
20	crème	0	$4,0 \cdot 10^8$
23	crème	0,01	$3,0 \cdot 10^9$
29	crème	0,08	$2,3 \cdot 10^{11}$
35	orange	0,17	$4,0 \cdot 10^{10}$
45	orange	0,54	$4,3 \cdot 10^{10}$
60	orange	0,55	$3,7 \cdot 10^{10}$

fonction du temps d'incubation est présentée à la figure 3. Sur un plan général, l'ensemble des résultats expérimentaux permettent de constater que :

- l'évolution de la quantité de la matière sèche en fonction du temps d'incubation est analogue à celle de l'absorbance à 650 nm ; cependant, pour les premières heures de culture, les valeurs d'absorbance à 650 nm et surtout celles de matière sèche sont imprécises, en raison des faibles concentrations cellulaires ;
- en fin de culture, les concentrations cellulaires sont voisines de 2 g/L pour la matière sèche, ce qui correspond à 8 pour l'absorbance à 650 nm ;
- l'évolution de la concentration en cellules

viables en fonction du temps de culture se divise en trois phases : la première est une phase de latence et d'initiation de la croissance (temps d'incubation inférieur à 16 h), la seconde est une phase de croissance active (temps d'incubation compris entre 16 heures et 60 heures environ), la dernière est une phase stationnaire qui débute aux environs de la 60e heure de culture ; au-delà de la centième heure de culture, le nombre de cellules viables commence à décroître ;

- la quantité de pigments mesurée par absorbance à 450 nm suit la même évolution que celle observée pour la quantité de matière sèche ou l'absorbance à 650 nm. Elle ne diminue pas lorsque certaines cellules

Fig 4. Étude des corrélations linéaires existant entre la quantité de matière sèche (g/L) et l'absorbance à 650 nm.

Linear correlations established between dry matter (g/L) and absorbance at 650 nm.

de *B linens* deviennent inactives (légère réduction du nombre de UFC/mL après la 100e heure).

Corrélations entre les méthodes de mesure de la concentration cellulaire

Corrélation entre la quantité de matière sèche et l'absorbance à 650 nm

Les résultats présentés dans le tableau I et la figure 4 permettent de constater que :

- aucune différence significative de relation n'est obtenue entre les deux essais lorsque la relation est étudiée sur l'ensemble de la cinétique (temps d'incubation de 8 jours) ;

- la linéarité de la relation est satisfaisante ($R^2 \geq 0,94$) sur la totalité de la cinétique, quel que soit l'essai considéré ; la pente et l'ordonnée à l'origine de la régression sont indépendantes de l'essai puisque l'hypothèse d'égalité des régressions (Test-F) est vérifiée ;
- quel que soit l'essai considéré, la relation 2 traduisant la quantité de matière sèche (PS ; g/L) en fonction de l'absorbance à 650 nm (A_{650}) s'écrit :

$$PS = 0,3 + 0,24.A_{650} \quad (2)$$

- il existe un seuil minimal de matière sèche en dessous duquel aucune estimation de l'absorbance à 650 nm n'est possible ; ce seuil est de 0,3 g/L ;
- lorsque l'étude est limitée à la seule

Fig 5. Étude des corrélations linéaires existant entre la quantité de pigments (l'absorbance à 450 nm) et l'absorbance à 650 nm.

Linear correlations established between pigment quantity (absorbance at 450 nm) and absorbance at 650 nm.

phase de croissance, bien que la linéarité des relations individuelles soit acceptable ($R^2 \geq 0,86$), l'hypothèse d'égalité des essais n'est plus vérifiée.

Corrélation entre la quantité de matière sèche et la quantité de pigments

Les résultats présentés dans le tableau I permettent de constater que si l'on considère la totalité de la culture, bien que la linéarité des régressions de chaque essai soit acceptable ($R^2 \geq 0,86$), l'hypothèse d'égalité des essais n'est jamais satisfaite. De plus, il existe un seuil minimum de détection de la quantité de matière cellulaire sèche de 0,2 g/L.

De plus, lorsque l'étude de la corrélation est limitée à la phase de croissance, la linéarité des deux essais pris individuellement ou ensemble est mauvaise ($R^2 = 0,70$) et les deux essais sont statistiquement différents.

Corrélation entre l'absorbance à 650 nm et la quantité de pigments

Les résultats présentés dans le tableau I et dans la figure 5 montrent que lorsque la culture est considérée dans son ensemble, la linéarité de la corrélation est bonne ($R^2 \geq 0,90$). Le test F étant vérifié à un seuil de probabilité de 0,05, les deux essais sont identiques. La régression reliant les absorbances à 650 nm et à 450 nm correspond alors à la relation 3. Cette relation montre un seuil de détection minimal en absorbance à 650 nm de 0,3.

$$A_{650} = -0,30 + 18,1.A_{450} \quad (3)$$

Les mêmes observations sont faites lorsque l'étude de la corrélation entre l'absorbance à 650 nm et la quantité de pigments est limitée à la phase de croissance. La régression ainsi obtenue correspond à la relation 4 :

$$A_{650} = -0,01 + 14,73.A_{450} \quad (4)$$

Application de la méthode de dosage des pigments de *B linens* au fromage

Les résultats de mesure de la concentration totale en *B linens* à la surface de fromages affinés entre 2 jours et 60 jours font l'objet du tableau II. Chaque résultat rapporté (absorbance à 450 nm et concentration en cellules viables) est la moyenne de trois déterminations. La coloration des fromages par *B linens* n'est observée à l'œil nu qu'à partir du 20^e jour d'affinage. Cela est confirmé par étude des mesures d'absorbance à 450 nm, qui traduisent la quantité de pigments de *B linens*. Plus la couleur crème-orange de la croûte du fromage (observée à l'œil nu) est intense, plus la quantité de pigments est élevée.

La concentration en cellules viables de *B linens* est de $4,4 \cdot 10^6$ UFC/mL à 2 jours. Elle augmente régulièrement à partir du 15^e jour jusqu'à atteindre $2,3 \cdot 10^{11}$ UFC/mL vers le 29^e jour d'affinage et diminue progressivement par la suite. En revanche, la quantité de pigments augmente avec la durée d'affinage au moins jusqu'au 45^e jour. Cela pourrait s'expliquer en supposant que la quantité totale de cellules de *B linens* continue d'augmenter alors que le maximum de cellules viables a été atteint et commence même à décroître.

DISCUSSION

La pigmentation orange des colonies de *B linens* est un critère taxonomique reconnu (Grecz et Dack, 1961). Mais, à notre connaissance, les études concernant les pigments cellulaires de *B linens* ont été purement analytiques et qualitatives (Jones et al, 1973 ; Khol et al, 1983). Elles n'ont pas été utilisées jusqu'à maintenant comme moyen de mesure de la croissance de *B linens*, même en culture pure. Même l'influence de différents facteurs déjà observés (lumière, pH, NaCl...) n'a pas été étudiée d'un point de vue quantitatif. Notre étude permet de montrer que la quantité de

pigments produits par la souche de *B. linens* ATCC 9175 est indépendante de la concentration en NaCl et/ou du pH du milieu de culture utilisé. Cette observation est en accord avec celle de Crombach (1974) dans le cas de concentrations en NaCl inférieures à 4 %.

Selon la procédure d'extraction utilisée, les pigments sont totalement extraits de la membrane des cellules lorsque le méthanol est utilisé pur à 25 °C. Dès lors, la potasse (5N) n'agit plus sur le culot d'extraction, comme cela a été montré par Grecz et Dack (1961) et Jones et al (1973).

Le même résultat a été obtenu lors du traitement de bactéries en surface de fromage ; cela laisse supposer que le méthanol agit de façon similaire sur les pigments cellulaires de *B. linens*, même si une partie de la matière grasse du fromage est extraite en même temps que les pigments.

La valeur du pic d'absorbance à 450 nm traduit correctement la quantité de pigments extraits des cellules de *B. linens*. En effet, l'étude de l'absorbance de l'extrait méthanolique des pigments cellulaires des cultures de *B. linens* ATCC 9175 en milieu liquide permet de définir deux longueurs d'onde pour lesquelles l'absorbance présente un pic caractéristique : 392 nm et 450 nm.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Jones et al (1973), qui montrent que les pics d'absorbance des extraits méthanoliques sont fonction de la souche de bactérie corynéforme étudiée mais restent situés entre 360 nm et 480 nm et sont, en général au nombre de deux ou trois par souche. Avec la même souche de *B. linens* que celle utilisée ici (ATCC 9175), Khol et al (1983) ont montré l'existence de trois pigments. Dans le méthanol, ces derniers présentent une couleur jaune-orange et le même pic d'absorbance (454 nm).

Le pic majeur que nous obtenons se trouve à peu près à la même longueur d'onde (450 nm) que celui de Khol et al (1983), mais nous en obtenons un deuxième, moins important, à 392 nm.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence : soit Khol et al (1983) ne l'ont pas mentionnée (en effet, Jones et al [1973] trouvent également un second pic à 400 nm pour deux autres souches de *B. linens*), soit elle est due à la différence de composition des milieux de culture utilisés. D'ailleurs, l'influence de la composition du milieu sur la pigmentation permettrait également d'expliquer la différence entre les pics observés sur le milieu liquide et les fromages. En effet, bien que la composition du milieu liquide simule celle d'un fromage jeune, elle n'est pas strictement identique et ne comporte pas de matière grasse. De plus, la matière grasse du fromage extraite par le méthanol interfère directement sur les mesures d'absorbance dans la plage 300-420 nm, même lorsque le protocole expérimental permet d'en éliminer une grande partie.

En ce qui concerne l'âge de la culture, deux cas ont été considérés : soit la phase de croissance seule (temps de culture inférieur à 60 heures) soit l'ensemble de la culture (150 heures). Pour chaque essai, la corrélation linéaire reliant l'absorbance à 650 nm et la quantité de matière sèche est bonne ($R^2 > 0,9$) que l'étude soit réalisée sur l'ensemble de la cinétique ou seulement sur la phase de croissance. Cependant, comme le montre le test de Fisher, cette corrélation n'est pas significativement indépendante de l'essai. Cela s'explique en partie par l'imprécision des valeurs d'absorbance à 650 nm (Kouomegne et al, 1984) et surtout, des pesées pour les faibles concentrations bactériennes (Guiraud et Galzy, 1980). De plus, comme le supposent Famelart et al (1987), la quantité de matière sèche peut être surestimée par la production de polysaccharides associée au développement de *B. linens*.

En ce qui concerne la relation entre les quantités de pigments et de matière sèche, la corrélation linéaire obtenue pour chaque culture est satisfaisante ($R^2 > 0,86$) tant pour la phase de croissance que pour l'en-

semble de la culture. Cependant, la relation linéaire obtenue est également dépendante de l'essai, probablement pour les mêmes raisons que celles évoquées ci-dessus à propos de la détermination de la matière sèche.

En revanche, en ce qui concerne la relation entre la quantité de pigments et l'absorbance à 650 nm, la corrélation linéaire obtenue est satisfaisante ($R^2 \geq 0,9$) et indépendante de la culture considérée. Cela est vrai que la culture soit limitée à la phase de croissance ou considérée dans son ensemble. Cependant, les relations obtenues ne sont vérifiées qu'au dessus d'un seuil de détection de 0,3 unité d'absorbance à 650 nm. Au-delà de ce seuil, la quantité de pigments des extraits méthanoliques permet donc de mesurer la concentration totale en cellules de *B linens*.

Dans le cas des fromages, l'extrait méthanolique des pigments de *B linens* est réalisé sur 0,5 g de croûte. Pour extraire les matières grasses de ce type de produits, on utilise couramment le méthanol. Mais, lors de l'extraction des pigments de *B linens* en présence de fromage, une partie de la matière grasse du produit est également solubilisée ; ce qui provoque une interaction lors des mesures d'absorbance à 450 nm. Pour éviter cette interaction, les extraits méthanoliques sont placés 1 heure à 4 °C avant filtration à froid, afin d'insolubiliser les matières grasses du fromage. Dans ces conditions, le pic d'absorption à 450 nm de la solution méthanolique est le même pour les fromages que pour les cultures en milieu liquide.

L'étude de la concentration totale en *B linens*, par mesure de la quantité de pigments en fonction de la durée d'affinage, est réalisée sur une série de fromages affinés de 2 à 60 jours. Pendant les 3 premières semaines de maturation, la concentration totale en cellules de *B linens* est relativement faible. Elle croît ensuite régulièrement jusqu'au 60^e jour d'affinage. La concentration en cellules viables passe par un maximum au 29^e jour d'affinage, comme cela a été observé dans le cas

du Pont-l'Évêque par Daluzeau (1986). La technique mise au point s'avère donc utile pour étudier les évolutions de concentrations microbiennes et les cinétiques correspondantes.

Cependant, dans le cas de fromages comportant une flore d'affinage plus complexe, la mesure de la quantité de pigments (absorbance à 450 nm) risque de représenter non seulement les pigments de *B linens* mais l'ensemble des pigments des micro-organismes extractibles par le méthanol et capables d'absorber la lumière à 450 nm.

En conséquence, la méthode mise au point n'est utilisable que dans le cas de fromages ensemencés avec une flore d'affinage bactérienne limitée à *B linens* ATCC 9175, seule ou en présence d'autres bactéries non pigmentées. Dans le cas de l'ensemencement avec d'autres souches de *B linens*, dont la pigmentation ne dépend pas de la lumière, il serait simplement nécessaire de vérifier certains des résultats obtenus avec ATCC 9175. Pour les autres bactéries pigmentées, l'ensemble de l'étude serait à reprendre.

RÉFÉRENCES

- Afnor NF 04-282 (1985) Fromages et fromages fondus, détermination de la matière sèche (méthode de référence). In : *Contrôle de la qualité des produits laitiers, analyses physiques et chimiques*. (S. Amariglio, éd), 3^e éd., Tec & Doc Lavoisier, Paris, 581-585
- Bourgeois CM, Mafart P (1991) Techniques globales d'évaluation de la microflore. In : *Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*, vol 3, Le contrôle microbiologique (Bourgeois CM, Leveau JY, eds). Tec & Doc Lavoisier APRIA, Paris, 50-71
- Boyaval P, Desmazeaud MJ (1983) Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Lait* 63, 187-216
- Crombach WHJ (1974) Morphology and physiology of coryneform bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 40, 361-376
- Dagnelie P (1992) Les tests d'hypothèses. In : *Statistiques théoriques et appliquées*, tome 1. Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux, 415-444
- Dagonneau H (1979) Étude des acides gras et des hydrocarbures de *Brevibacterium linens*. Recherche de ces composés dans quelques fromages. Thèse de 3^e cycle. Université de Paris XI-ENSIA, 81 p

- Daluzeau D (1986) Le livarot. Thèse de docteur vétérinaire, École nationale vétérinaire de Toulouse, 76 p
- Driehuis F, Teerstra EJM (1992) Method for turbidimetric estimation of lactic acid bacteria in fat-containing milk. *Neth Milk Dairy J* 46, 209-215
- Famelart MH, Kobilinsky A, Bouillanne C, Desmazeaud MJ (1987) Influence of temperature, pH and dissolved oxygen on growth of *Brevibacterium linens* in a fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol* 25, 442-448
- Fautz E, Reinchenbach H (1980) A simple test for flexirubin-type pigment. *FEMS Microbiol Lett* 8, 87-91
- Grecz N, Dack GM (1961) Taxonomically significant color reactions of *Brevibacterium linens*. *J Bacteriol* 82, 241-246
- Guéguen M (1984) Contribution à la connaissance de *Geotrichum candidum* et notamment de sa variabilité. Conséquences pour l'industrie fromagère. Thèse de docteur d'état es sciences, Université de Caen, 471 p
- Guiraud J, Galzy P (1980) L'examen au microscope. I. Techniques générales de la microbiologie. In : L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, Éditions de l'Usine Nouvelle, Paris, Collection Génie alimentaire, 11-29
- Hadley WK, Waldman F, Fulwyler M (1985) Rapid microbiological analysis by flow cytometry. In : *Instrument methods for rapid microbiological analysis* (Nelson W, ed). Elsevier, New-York, 67-89
- Jones D, Watkins J, Erickson SK (1973) Taxonomically significant color changes in *Brevibacterium linens*. Probably associated with a carotenoid-like pigment. *J Gen Microbiol* 77, 145-150
- Khol W, Achenbach H, Reichenbach H (1983) The pigments of *Brevibacterium linens*: aromatic carotenoids. *Phytochemistry* 22, 207-210
- Koumagne R, Bracquart P, Linden G (1984) Application d'un réactif de transpiration du lait au dénombrement de bactéries. *Lait* 64, 418-435
- Le Graet Y, Brûlé G (1988) Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle de type Camembert. *Lait* 68, 219-234
- Leclercq-Perlat MN, Bergère JL, Corrieu G (1995) Mise au point d'une méthode de dénombrement de la totalité des cellules de levures de la surface d'un fromage à pâte molle. *Lait* 75, 151-168
- Lecocq J, Guéguen M (1994) Effect of pH and sodium chloride on the interaction between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*. *J Dairy Sci* 77, 2890-2899
- Lenoir J (1991) Deux exigences : l'hygiène et le goût. *Rev Lait Fr* 49, 5-6
- Lenoir J, Lamberet G, Schmidt JL (1983) L'élaboration d'un fromage : l'exemple du Camembert. *Pour Sci* 69, 30-42
- Lenoir J, Lamberet G, Schmidt JL, Tourneur C (1985) La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* 41, 23-50
- Miozzari GF, Niederberger P, Hutter R (1978) Permeabilization of microorganisms by Triton X 100. *Anal Biochem* 90, 220-223
- Mulder EG, Adams AD, Antheunisse J, Deinema MH, Woldendorfs JW, Zevenhuizen LPTM (1966) The relationship between *Brevibacterium linens* and bacteria of genus *Arthrobacter*. *J Appl Bacteriol* 29, 44-71
- Piton C (1988) Évolution de la flore microbienne de surface de gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Lait* 68, 419-434
- Vessereau A (1988) Méthodes statistiques en biologie et en agronomie. Test de comparaison de moyennes et de variances. (Baillière JB, éd), Tec et Doc Lavoisier, Paris, 134-158
- Yamaguchi M (1957) On carotenoids of sponge « *Reniera japonica* ». *Bull Chem Soc Jpn* 30, 111-114