Article original

Effet de la teneur en NaCl sur la fermentation du lactate par *Propionibacterium freudenreichii* dans des minifromages à pâte cuite

Romain Richoux, Éliane Faivre^a, Jean-René Kerjean

Institut technique du gruyère, 73, rue de Saint-Brieuc, BP 6224, 35042 Rennes cedex, France
^a adresse actuelle : BG SAS, BP1, 52150 Illoud, France

(Reçu le 29 juillet 1997 ; accepté le 14 octobre 1997)

Abstract — Effect of NaCl content on lactate fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* in small scale Swiss-type cheeses. The effect of salt content on the propionic acid fermentation from 23 strains of *Propionibacterium freudenreichii* was studied in small-scale Swiss-type cheeses. Two-hundred-and-thirty-four cheeses were made with low bacterial count microfiltered milk. Salt in moisture (S/M) of the cheeses (w/w) was 1% (i), 2% (ii) or 3% (iii). During hot room ripening, these values were found respectively in the center of the loaf of Emmental-cheese (i), in an area between 2–8 cm depth (ii), and in the vicinity of the rind (iii). The propionic acid fermentation was followed weekly by measuring cheese volume, volatile fatty acids (VFA) and lactate content during hot room ripening. The increase of S/M reduced dramatically the propionic acid fermentation. In 3% S/M cheeses, VFA contents were 4 to 5 times lower than in the 1% S/M cheeses. Residual lactate content increased in the same extent. Cheese opening was about 12 times lower in 3% S/M cheeses. The effect of increasing S/M was very strain dependent, from low stimulation for some strains to a total inhibition of the propionic acid fermentation for the other ones. The sensitivity to salt was independent from the technological abilities in usual conditions (1% S/M). CO₂ production was the most affected by S/M increase. Some salt-sensitive strains showed a molar propionate/acetate ratio close to one. This value corresponds to the third metabolic pathway described for propionibacteria: three lactates → 1 succinate + 1 propionate + 1 acetate. A good discrimination of the 21 strains from our own collection was obtained by factorial correspondence analysis (FCA). © Inra/Elsevier, Paris.

propionibacteria / NaCl / Swiss-type cheese

Résumé — L'effet de la teneur en sel sur la fermentation propionique de 23 souches de *Propionibacterium freudenreichii* a été appréhendé au cours de la fabrication de 234 minifromages à pâte cuite de type emmental. Les rapports sel sur humidité (S/M) des fromages (1, 2 et 3 % p/p) correspondaient aux valeurs habituellement rencontrées pendant l'affinage en cave chaude respec-

* Correspondance et tirés à part.

tivement au centre de la meule d'emmental, dans une zone comprise entre 2 et 8 cm de profondeur et dans la zone corticale. La fermentation propionique était suivie pendant l'affinage en cave chaude par des mesures de volume et de teneurs en acides acétique et propionique (acides gras volatils, AGV) et en lactate. D'une manière générale, l'augmentation du rapport S/M de 1 à 3 % conduisait à une réduction de la teneur en AGV d'un facteur 4 à 5. La concentration en lactate résiduel augmentait dans les mêmes proportions. L'ouverture des fromages diminuait d'un facteur 12. L'effet enregistré (d'une stimulation à une inhibition totale) était fortement dépendant de la souche considérée. Cet effet était indépendant des performances des souches en conditions d'utilisations habituelles (1 % S/M). La production de CO_2 était le facteur le plus affecté par l'augmentation de S/M. Pour certaines souches, le rapport molaire propionate/acétate, proche de 1, correspondait à la troisième voie métabolique décrite pour les bactéries propioniques (3 lactates $\rightarrow$ 1 succinate + 1 propionate + 1 acétate). Une analyse factorielle des correspondances a permis de classer les souches selon leurs performances en conditions usuelles et leur sensibilité au sel. Un tel classement permet au fromager de choisir les souches les plus appropriées à sa technologie particulière de fabrication et d'affinage. © Inra/Elsevier, Paris.

bactérie propionique / NaCl / emmental

1. INTRODUCTION

L'influence de la teneur en chlorure de sodium sur la fermentation propionique de l'emmental reste relativement méconnue et peu d'études se sont intéressées directement à ce sujet [4, 21, 25]. Empiriquement, on sait que le sel exerce une action négative sur la croissance et l'activité des bactéries propioniques. Par exemple, la population propionique et la teneur en acides acétique et propionique restent très faibles dans la zone corticale de l'emmental en raison, notamment, de la forte teneur en sel [13].

Différents auteurs rapportent l'influence de la teneur en sel sur la croissance et le métabolisme des bactéries propioniques [9, 10, 11, 15]. Ils estiment à 3 % le rapport sel sur humidité (S/M) critique à pH 5,3, au-dessus duquel la croissance des bactéries propioniques est fortement inhibée. A pH 7,0, cette valeur avoisine 6 % (a_w : 0,955) même si des auteurs observent une réduction de la croissance dès 0,5 % pour certaines souches [4, 15, 21, 25]. Pour des valeurs d' a_w comprises entre 0,95 et 0,99, Ruegg et al. [21] observent une relation linéaire entre le logarithme

de la population propionique et l' a_w . Une réduction d' a_w de 0,99 à 0,98 double le temps de latence et le temps de génération chez deux souches de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* testées. A pH 6,60, ces chercheurs n'observent plus de croissance en dessous de 0,955. Tous les auteurs insistent sur l'importance du couple pH-rapport S/M.

Guinee et Fox [11] rapportent que le niveau critique du couple pH-S/M varie suivant les souches. De très rares données ont été publiées sur cet aspect. Des travaux suisses (Ruegg et Blanc, cités par Guinee et Fox [11]) indiquent simplement que *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* résiste mieux que *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* à une diminution de l' a_w des fromages. Gudkov [10] mentionne que les technologues russes sélectionnent des souches de propionibactéries résistantes au sel pour les réensemencer dans le Sovietski, une pâte cuite dé lactosée salée à 1,8–2 % (S/M : 5–6 %).

Dans le cadre de la caractérisation de sa collection de souches de *Propionibacterium freudenreichii*, l'Institut Technique du Gruyère (ITG) a entrepris d'étudier l'in-

fluence de la teneur en sel sur la fermentation propionique. Deux-cent-trente-quatre minifromages à pâte cuite ont été fabriqués à partir de lait microfiltré réensemencé suivant le protocole développé par l'ITG [20]. Deux teneurs en sel augmentées (0,7 % et 1,1 %) ont été testées et comparées à la concentration habituelle des minifromages (0,35 %).

La valeur de 0,7 % (S/M $\approx$ 2 %) correspond à la limite supérieure de la teneur globale de l'emmental français [6]. C'est aussi la teneur en chlorure de sodium trouvée dans la zone sous croûte (2–5 cm à mi-rayon, 2–8 cm en talon [5]) de l'emmental courant (0,4–0,5 g de NaCl/100 g de fromage) en cave chaude. La valeur de 1,1 % correspond à un rapport S/M voisin de 3 %, le seuil critique mentionné dans la bibliographie. On retrouve cette concentration dans la zone corticale, sous la croûte de l'emmental courant, et dans la région sous croûte des fromages plus salés.

Outre l'aspect cognitif, l'intérêt pratique d'une telle étude est manifeste puisque seules les souches résistantes à des teneurs élevées en sel peuvent donner une fermentation homogène dans la meule d'emmental. Inversement, l'emploi de souches sensibles peut être recherché pour ralentir voire arrêter la fermentation propionique lors de la diffusion du sel au centre de la meule. Enfin, l'étude de la sensibilité au sel d'un grand nombre de souches de *P. freudenreichii* permet indirectement d'appréhender la diversité de comportement des souches « sauvages », présentes dans les différentes fabrications fromagères où une fermentation propionique peut être indésirable.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

Vingt-et-une souches de *Propionibacterium freudenreichii* appartenant à la collection ITG (ITGP1 à ITGP25) et deux souches commer-

ciales de *P. freudenreichii* (SC1 et SC2) ont été testées. Ces 23 souches possèdent des aptitudes technologiques appropriées dans les minifromages à pâte cuite de type emmental [20] : les productions d'acides acétique et propionique et de gaz carbonique sont suffisantes et se développent suivant une cinétique adéquate pour former une ouverture correspondant à une augmentation du volume des fromages de l'ordre de 20 % au cours des 28 j de cave chaude à 24 °C. Quatre souches de la collection ITG (ITGP2, ITGP3, ITGP7 et ITGP10) n'ont pas été incluses dans cette étude en raison de leur faible production de gaz carbonique dans les conditions habituelles [20].

L'ensemencement du lait en bactéries propioniques (3×10^5 UFC/mL) était effectué après deux cultures successives sur bouillon BYC lactate [18] à 30 °C jusqu'à une valeur d'absorbance (650 nm) de 1. L'ensemencement était contrôlé par un test de recherche de catalase, un examen microscopique et un dénombrement sur gélose BYC lactate (incubation en anaérobiose à 30 °C pendant 8 j) sur la dernière culture comme décrit par Richoux et Kerjean [20].

2.2. Minifabrications

Deux-cent-trente-quatre minifabrications ont été réalisées selon le protocole décrit par Richoux et Kerjean [20]. Le lait mis en œuvre était épuré bactériologiquement par microfiltration tangentielle de lait écrémé (porosité 1,4 μ m) et par traitement thermique de la crème à 115 °C pendant 20 s. La fabrication des minifromages de 800 g à partir de 10 L de lait suivait un protocole standardisé avec des paramètres de fabrication et des résultats intermédiaires constants. Des ferments lactiques lyophilisés concentrés à ensemencement direct (Texel, Dangé, France) étaient utilisés : lactocoques MA014, *Streptococcus thermophilus* TA060, *Lactobacillus helveticus* et *L. delbrueckii* subspp. *lactis* cocktail LH 100.

Les durées de saumurage (21 ou 79 h) étaient calculées de manière à obtenir respectivement des teneurs en sel de 0,7 g/100 g ou de 1,1 g/100 g de fromage soit des rapports S/M voisins de 2 % ou de 3 % (p/p). Les résultats des fermentations réalisées avec 1 % de S/M ont été publiés précédemment [20]. L'affinage était conduit sous paraffine pendant 21 j à 11 °C (cave froide) puis pendant 28 j à 24 °C (cave chaude).

Tableau I. Analyse de variance des paramètres de fermentation propionique après 14 jours de cave chaude : carrés moyens, probabilité.**Table I.** ANOVA of the parameters of propionic acid fermentation after 14 days hot room ripening: mean squares, probability.

Variance	DDL ^a	Lactate	Lactate D	Lactate L	Acétate	Propionate	Volume
Totale	224	274 729 ^b (<i>p</i> < 0,001) ^c	25 692 (<i>p</i> < 0,001)	159 879 (<i>p</i> < 0,001)	16 668 (<i>p</i> < 0,001)	100 745 (<i>p</i> < 0,001)	16 327 (<i>p</i> < 0,001)
Souche (S)	24	810 663 (<i>p</i> < 0,001)	81 729 (<i>p</i> < 0,001)	445 640 (<i>p</i> < 0,001)	37 419 (<i>p</i> < 0,001)	273 794 (<i>p</i> < 0,001)	4 289 (<i>p</i> < 0,001)
S/M ^d	2	13 518 612 (<i>p</i> < 0,001)	1 016 519 (<i>p</i> < 0,001)	7 291 169 (<i>p</i> < 0,001)	801 779 (<i>p</i> < 0,001)	5 451 847 (<i>p</i> < 0,001)	5 520 (<i>p</i> < 0,001)
S × S/M	50	146 171 (<i>p</i> < 0,001)	15 433 (<i>p</i> < 0,001)	94 522 (<i>p</i> < 0,001)	10 709 (<i>p</i> < 0,001)	53 450 (<i>p</i> < 0,001)	3 891 (<i>p</i> < 0,001)
Résiduelle	150	53 533	6 797	39 988	4 787	16 843	2 626

^a Degrés de liberté. ^b Carré moyen. ^c Probabilité. ^d Sel/humidité.^a Degree of freedom. ^b Mean square. ^c Probability. ^d Salt in moisture.**Tableau II.** Effet du rapport sel/humidité sur les paramètres de la fermentation propionique après 14 jours de cave chaude (toutes souches confondues).**Table II.** Effect of salt in moisture on the parameters of propionic acid fermentation after 14 days hot room ripening (all strains).

Sel/Humidité	1 %	2 %	3 %
Lactate total (mg/100 g)	316 ^c	563 ^b	1143 ^a
Lactate D (mg/100 g)	79 ^b	97 ^b	289 ^a
Lactate L (mg/100 g)	237 ^c	465 ^b	854 ^a
Production d'acétate (mg/100 g)	273 ^a	153 ^b	67 ^c
Propionate (mg/100 g)	662 ^a	412 ^b	123 ^c
Augmentation volume (%)	12,9 ^a	4,7 ^b	1,1 ^c

^{a, b, c} : groupes homogènes du test de Newmann-Keuls. Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes (*p* > 0,05).^{a, b, c} : Newmann-Keuls' test: means followed by the same letter do not differ statistically (*P* > 0.05).

Outre les contrôles classiques de fabrication et de composition des minifromages [20], les teneurs en lactates L(+) et D(-) (méthode enzymatique, Boehringer, Mannheim, Allemagne), en acides gras volatils [2], ainsi que le volume (méthode par immersion) des minifromages étaient déterminés tous les 7 j pendant l'affinage en cave chaude. La petite taille des minifromages ne permettait pas d'effectuer des prélèvements supplémentaires destinés à un suivi de la population propionique en cours d'affinage.

2.3. Protocole expérimental

Trois répétitions, par souche de *Propionibacterium*, étaient comparées à 9 témoins (minifromages fabriqués sans ensemencement propionique) pour chaque niveau de salage.

2.4. Traitement des résultats

Pour chaque stade d'affinage, les résultats étaient traités par analyse de variance à deux facteurs (souche : 23 niveaux ; sel/humidité : 3 niveaux) au seuil de 0,05 sur le logiciel STATITCF (ITCF, Paris, France). Un test de Newman-Keuls classait ensuite les traitements en groupes homogènes pour les deux facteurs étudiés, souche et S/M. Le nombre de combinaisons ne permettait pas d'effectuer ce test sur les interactions S/M $\times$ souche avec le logiciel utilisé.

Pour chaque souche, l'effet de l'augmentation de la teneur en sel était analysé en comparant deux à deux les valeurs enregistrées à 2 % ou à 3 % de S/M avec celles observées à 1 % de S/M [20]. Pour cela, un test non paramétrique des rangs de Wilcoxon-Mann-Whitney était utilisé au seuil de 0,05. Ce test permettait d'exprimer l'effet de l'augmentation de S/M en termes de retard par rapport aux conditions usuelles (1 % S/M).

La variabilité de fermentation de 21 souches de *P. freudenreichii* de la collection ITG était visualisée par une analyse factorielle des correspondances, effectuée à partir des données qualitatives obtenues précédemment.

3. RÉSULTATS

3.1. Minifabrications

Avant ensemencement, le niveau moyen de population du lait en flore mésophile aérobie revivifiable était de 70 UFC/mL (23 à 178 UFC/mL) et la population propionique résiduelle était inférieure à 5 UFC/mL.

Aucune différence significative d'ensemencement ($p > 0,05$) n'apparaît entre les souches propioniques pour les différents niveaux de teneur en sel ; les moyennes géométriques sont 5,48, 5,38 ou 5,54 $\log_{(10)}$ UFC/mL pour respectivement 1, 2 ou 3 % de S/M.

Les paramètres de fabrication et les résultats intermédiaires (résultats non montrés) correspondent à ceux enregistrés par Richoux et Kerjean [20]. Conséquence attendue (et non corrigée) de l'augmentation de la durée de saumurage [5], l'extrait sec des minifromages augmente de 63 g/100 g pour 1 % à 64,0 g/100 g pour 2 % et à 65,9 g/100 g pour 3 % S/M. Les teneurs en chlorure de sodium pour 100 g de fromage s'élèvent respectivement à 0,37 g ($\sigma_{n-1} = 0,05$), 0,66 g ($\sigma_{n-1} = 0,10$) ou 1,13 g ($\sigma_{n-1} = 0,18$), correspondant à des rapports S/M de respectivement 1,0, 1,84 ou 3,25 %. Par souci de simplicité, les niveaux de S/M seront dénommés dans le texte par leurs valeurs initialement prévues : 1, 2 et 3 %.

Lors de la mise en cave chaude, les minifromages contenaient pour 100 g : 48 mg d'acide acétique ($\sigma_{n-1} = 14,1$ g), 1363 g de lactate total ($\sigma_{n-1} = 98$ g) dont 1032 mg de lactate L(+) ($\sigma_{n-1} = 76$ g) et 331 mg de lactate D(-) ($\sigma_{n-1} = 42$ g).

3.2. Effet global de la teneur en sel

Le tableau 1 résume l'analyse de variance pour les paramètres mesurés après 14 j d'affinage en cave chaude. Un effet hautement significatif ($p < 0,001$) de

chacun des deux facteurs (souche propionique et S/M) et de leurs interactions est systématiquement enregistré. Le facteur S/M explique environ 40 % de la variance observée (somme des carrés des écarts du facteur/somme des carrés des écarts totaux) : 35 % pour la teneur en lactate D(-), 40,7 % pour la teneur en lactate L(+), 43,9 % pour la teneur en lactate total, 42,9 % pour la teneur en acide acétique produit (teneur à J+14 moins teneur à l'entrée en cave chaude), 48,3 % de la teneur en acide propionique et 33,8 % des variations du volume.

L'augmentation de S/M se traduit globalement par une réduction de la fermentation propionique (tableau II). Le test de Newmann-Keuls discrimine systématiquement les fromages ayant des rapports S/M différents, qui forment chacun un groupe homogène. Cependant, la teneur en lactate D(-) reste équivalente pour 1 % et 2 % de S/M. Ceci pourrait indiquer que la consommation de lactate D(-) est moins sensible à l'augmentation de la teneur en sel. Ainsi, l'énantiomère D(-), qui constitue en moyenne 24 % du lactate initial, représente 23 % du lactate total consommé à J + 14 pour 1 % S/M contre 30 % pour 2 % S/M. Avec la souche ITGP11, la proportion de lactate D(-) dans le lactate total consommé passe de 20 % pour 1 % S/M à 37,9 % pour 2 % S/M.

L'augmentation de S/M de 1 % à 3 % divise respectivement par un facteur 4,1, 5,4 ou 4,99 la production d'acétate, de propionate ou la consommation de lactate total. L'augmentation de volume est divisée par un facteur 11,7. Le rapport molaire moyen propionate/acétate diminue de 1,96 pour 1 % S/M à 1,48 pour 3 % S/M. La réduction de ce rapport est beaucoup plus importante pour certaines souches. Avec la souche ITGP23, ce rapport passe de 2,48 pour 1 % S/M à 0,80 pour 3 % S/M.

L'augmentation de S/M de 1 % à 2 % réduit d'un facteur 1,6 à 1,8 les teneurs en acides acétique et propionique et d'un facteur 2,7 l'augmentation de volume.

3.3. Manifestations de l'augmentation de S/M

L'augmentation de S/M se manifeste de manière très variable selon la souche et le niveau de salage considérés. L'accroissement de S/M de 1 % à 2 % stimule la fermentation propionique de la souche commerciale SC1 (figure 1A). Après 7 j d'affinage en cave chaude, cette souche a consommé de manière significative ($p < 0,05$) plus de lactate (> 400 mg/100 g) et produit plus de propionate (> 110 mg/100 g) pour 2 % de S/M. Ce résultat inattendu a été confirmé au cours d'une seconde expérimentation mettant en oeuvre la souche lyophilisée (résultat non montré).

Un salage à 2 % S/M ne modifie ni le niveau final ni la cinétique de fermentation propionique pour 6 souches de *P. freudenreichii* (ITGP9, ITGP13, ITGP18, ITGP19, ITGP20, ITGP21). Aucune différence significative ($p > 0,05$) de variation dans le volume des minifromages ou des teneurs en lactate, acétate ou propionate n'apparaît entre 1 % et 2 % de S/M.

Un retard de fermentation de 7 à 14 j avec 2 % S/M est un cas de figure observé pour 8 souches (ITGP4, ITGP5, ITGP15, ITGP16, ITGP17, ITGP23, ITGP24, ITGP25) et pour 6 souches pour 3 % S/M (ITGP9, ITGP15, ITGP16, ITGP19, ITGP20, ITGP21). Dans ce cas, les vitesses de fermentation et les teneurs finales en acides gras volatils et en lactate restent identiques mais l'augmentation de S/M accroît la durée de la « phase de latence » (figure 1B).

Ce délai de fermentation s'accompagne d'une réduction de la production de CO_2 par 8 souches (ITGP1, ITGP6, ITGP8, ITGP11, ITGP12, ITGP14, ITGP22, SC2) pour un rapport S/M de 2 % et par 4 souches pour 3 % S/M (ITGP11, ITGP13, ITGP18, ITGP24). Ce phénomène se manifeste par un retard de gonflement des fromages plus important que celui de la pro-

Figure 1. Exemples de l'effet de l'augmentation du rapport sel/humidité (S/M) sur la fermentation propionique. A. Souche SC1 pour 1% et 2% S/M. B. Souche ITGP25 pour 1% et 2% S/M. C. Souche ITGP11 pour 1% et 2% S/M. ■ lactate pour 1% S/M ; □ lactate pour 2% S/M ; ● augmentation de volume pour 1% S/M ; ○ augmentation de volume pour 2% S/M.

Figure 1. Examples of the effect of salt in moisture (S/M) increase on the propionic acid fermentation. A. Strain SC1 in 1% and 2% S/M cheeses. B. Strain ITGP25 in 1% and 2% S/M cheeses. C. Strain ITGP11 in 1% and 2% S/M cheeses. ■ lactate for 1% S/M ; □ lactate for 2% S/M ; ● volume increase for 1% S/M ; ○ volume increase for 2% S/M.

duction d'acides gras volatils, ou bien par l'absence totale de gonflement (*figure 1C*). Avec 3 % de S/M, la fermentation reste incomplète. La teneur en propionate atteint un plateau de l'ordre de 300–400 mg/100 g contre 800–900 mg/100 g à 1 % S/M. La proportion de lactate résiduel avoisine 50 %.

Dans les minifromages à 3 % S/M, 6 souches (ITGP4, ITGP5, ITGP12, ITGP22, ITGP23, ITGP25) donnent une fermentation lente et tardive sans production massive de gaz carbonique et quatre souches (ITGP1, ITGP6, ITGP8, ITGP14) ne donnent pas de fermentation propionique significative (teneur en propionate voisine de 30 mg/100 g).

3.4. Analyse factorielle des correspondances

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été effectuée à partir des données qualitatives obtenues par analyse de variance. Le traitement des données brutes par analyse en composantes principales (ACP) donnait en effet des résultats moins discriminants ou même incohérents. L'ACP construisait, par exemple, un axe corrélé avec la teneur en propionate pour 1 % S/M, positivement à J + 14 et négativement à J + 28.

Pour les performances en conditions usuelles (1 % S/M), les paramètres suivants ont été retenus : durée de cave chaude nécessaire à l'obtention d'une teneur en propionate de 800 mg/100g environ (variable 1 % C3) et délai supplémentaire pour observer une expansion des minifromages de l'ordre de 20 % (variable 1 % Vol). Ces paramètres rendent compte respectivement de la vitesse apparente de fermentation des souches et de leur production gazeuse, rapportée à la production de propionate. Il s'agit des critères les plus discriminants relevés par Richoux et Kerjean [20].

Pour les rapports S/M de 2 % et 3 %, les paramètres pris en compte sont les retards observés relativement au rapport à 1 % S/M : retard d'obtention d'une teneur en propionate de 800 mg/100 g (variables 2 % C3, 3 % C3) et retard supplémentaire pour un gonflement des minifromages (variables 2 % Vol, 3 % Vol).

Les trois principaux axes de l'AFC décrivent 84% de la variabilité. Le premier axe, expliquant 39,3 % de l'inertie, est corrélé (-0,636) à la réduction de production gazeuse pour 2 % S/M (2 % Vol). Le deuxième axe contribue pour 30,8 % à l'inertie totale. Il est corrélé (+ 0,897) à une faible aptitude à la production de CO₂ pour 1 % S/M (1 % Vol). Le troisième axe (14,1 % de l'inertie) est corrélé (+ 0,773) au caractère tardif de la fermentation pour 1 % S/M (1 % C3).

La *figure 2* représente la distribution des 21 souches de la collection ITG selon les deux axes principaux. Le groupe formé par ITGP19, ITGP20 et ITGP21 correspond aux souches fortement productrices de CO₂ et très peu sensibles à la teneur en sel. La souche ITGP9 s'avère peu productrice de CO₂ en conditions usuelles (1 % S/M) mais est résistante au sel. Les ensembles comprenant d'une part ITGP17, ITGP18 et ITGP23 et d'autre part les souches ITGP4, ITGP5, ITGP13, ITGP15, ITGP16, ITGP24, ITGP25 regroupent des souches moyennement sensibles au sel et respectivement peu ou fortement productrices de gaz carbonique en conditions usuelles. De la même manière, les souches sensibles au sel se répartissent en deux groupes, fortement (ITGP1, ITGP6, ITGP12 et ITGP14) ou faiblement (ITGP8, ITGP11 et ITGP22) productrices de gaz à 1 % S/M.

Dans la gamme de S/M étudiée, un tiers des souches propioniques est très sensible à la teneur en sel. Dix souches sur 21 possèdent une sensibilité moyenne, principalement visible pour 3 % S/M. Quatre souches sont particulièrement résistantes

Figure 2. Projection de 21 souches de *Propionibacterium freudenreichii* de la collection ITG selon les deux axes principaux de l'analyse factorielle des correspondances. L'axe des abscisses est corrélé négativement ($-0,636$) à la variable 2 % Vol (réduction de la production de CO_2 pour 2 % S/M). L'axe des ordonnées est corrélé positivement ($+0,897$) à la variable 1 % Vol (intensité du rapport propionate/ CO_2).

Figure 2. Projection of the 21 ITG-strains of *Propionibacterium freudenreichii* according to the 2 main axis of factorial correspondence analysis. X-axis is correlated negatively ($-0,636$) with 2% S/M variable (decrease of CO_2 production in 2% S/M-cheeses). Y-axis is correlated ($+0,897$) with 1% Vol variable (intensity of propionate/ CO_2 ratio in 1% S/M cheeses).

au sel car il faut 3 % de S/M pour observer une légère inhibition de la fermentation (retard de 7 j).

4. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de caractériser les aptitudes fermentaires de souches de *P. freudenreichii* dans les dif-

férentes conditions de rapport sel/humidité auxquelles ces souches sont confrontées au sein d'une meule d'emmental ou au sein de la diversité de teneur en sel des emmentals français.

La stimulation de la souche propionique SC1 par un rapport sel/humidité de 2 % apparaît particulièrement originale. Stadhouders [23] et Carcano et al. [4] ont

déjà observé un effet bénéfique de la teneur en sel sur la croissance des bactéries propioniques, mais pour de faibles concentrations en NaCl (0,5 % ou 1 % p/p) et/ou à un pH de 6,7, voisin de l'optimum de croissance des bactéries propioniques.

Les cas d'inhibition de la fermentation propionique par l'abaissement de l' a_w sont beaucoup plus fréquents. Une inhibition, au moins partielle, de la fermentation propionique concerne 15 souches (sur les 23 testées) de *P. freudenreichii* pour 2 % S/M et toutes les souches pour 3 % S/M. Une inhibition se manifestant par une forte réduction de la production de CO_2 , une fermentation incomplète ou non décelable, touche 8 ou 18 souches pour respectivement 2 % et 3 % S/M. Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux de Carcano et al. [4], qui estiment à 50 % la proportion des souches de *P. freudenreichii* insensibles à 2 % de sel. Cette différence provient probablement des conditions expérimentales de pH, proches de l'optimum, utilisées. En effet, selon Langsrud et Reinbold [15] et Guinee et Fox [11], l'abaissement du pH de 7,0 à 5,2 abaisse la concentration critique en sel de 6 % à 3 %.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'inhibition de la fermentation propionique. L'effet répressur du NaCl sur la vitesse de croissance des bactéries et sur leur niveau de population en phase stationnaire est un phénomène bien connu [17]. Chez *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, Ruegg et al. [21] ont observé une augmentation de la durée de la phase de latence et une réduction de la vitesse de croissance d'un facteur 2,5 lorsque l' a_w est réduit de 0,993 à 0,978. Cela se traduit par la multiplication du temps de génération apparent d'un facteur 5.

Dans notre étude, l'absence de dénombrement de la flore propionique ne permet pas de conclusions définitives. Cependant, pour les quatre souches ne donnant pas de fermentation propionique signifi-

cative dans les fromages à 3 % S/M, il est possible d'estimer la flore propionique à 10^8 UFC/g en utilisant la corrélation entre le logarithme de la population propionique et la teneur en propionate proposée par Januel [14]. Le temps de génération apparent atteindrait alors 4 à 5 jours contre 18 h pour la souche de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* TL30 dans des fromages à 1 % de S/M [26]. Le comportement de TL30 s'apparentant à celui des 4 souches ITG dans les conditions usuelles, l'augmentation de S/M se traduirait donc également par un quintuplement du temps de génération apparent.

Une croissance limitée des souches ITGP11, ITGP13, ITGP18, ITGP24 dans les minifromages pour 3 % S/M peut également expliquer la stabilisation à un faible niveau de la fermentation propionique. Des travaux russes cités par Gudkov [10] montrent que la population propionique du Sovietski chute de $9 \cdot 10^7$ à 10^7 UFC/g lorsque le rapport S/M augmente de 3,6 % à 6 %.

L'augmentation de S/M peut provoquer également des modifications du métabolisme comme le mentionnent Bergère et Tourneur [3] pour les lactobacilles ou les microcoques. Chez *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, Ruegg et al. [21] notaient ainsi l'absence de production d'acides gras volatils pour des a_w compris entre 0,95 et 0,97 alors que la population propionique atteignait 10^8 à $5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Dans l'emmental, Crow et Turner [7] ont démontré le fonctionnement simultané de trois voies métaboliques conduisant à la production de CO_2 et d'acides gras volatils. L'équilibre entre ces voies métaboliques conduit à des rapports propionate/acétate et à une production de CO_2 très variables que l'équation de Fitz ($3 \text{ lactates} \rightarrow 2 \text{ propionate} + 1 \text{ acétate} + 1 \text{ } CO_2$) ne saurait traduire. La concentration en NaCl pourrait ainsi favoriser ou réprimer l'utilisation de l'une de ces voies métaboliques. Dans des fromages de comté,

Grappin et al. [9] ont ainsi observé une réduction du rapport molaire propionate/acétate de 1,6 à 0,74 lorsque le S/M augmentait de 2,7 % à 3,3 %.

Dans la présente étude, l'augmentation du volume des fromages est le facteur le plus affecté par l'augmentation de S/M (tableau II). Pour certaines souches, l'augmentation du rapport S/M provoque une diminution du rapport propionate/acétate, par une réduction plus importante de la production de propionate comparative-ment à celle d'acétate. A la différence de Grappin et al. [9], la production d'acétate provient exclusivement de la fermentation propionique puisque l'emploi de lait microfiltré permet une très faible contamination par les NSLAB (non-starter lactic acid bacteria) producteurs d'acétate (ITG/INRA, non publié). La production accrue d'acétate par ITGP23 pourrait alors provenir d'une forte utilisation de la voie de fixation du CO_2 sur le propionate décrite par Crow et Turner [7] : formation d'un succinate, d'un acétate et d'un propionate à partir de 3 lactates. Le rapport propionate/acétate observé pour cette souche correspond à l'utilisation exclusive de cette voie (rapport propionate/acétate de 1). Pour d'autres souches de sensibilité moins marquée, la réduction de la production gazeuse pourrait être attribuée à une utilisation plus importante, sans être exclusive, de cette voie métabolique. Un dosage de la teneur en succinate des fromages aurait éventuellement permis de valider cette hypothèse. Toutefois, la production simultanée de succinate par la voie de désamination de l'aspartate rend très délicate l'interprétation de ces dosages [7].

Comme le montre l'AFC (figure 2), la sensibilité au sel des souches propioniques est indépendante de leurs performances en conditions usuelles (1 % S/M). Richoux et Faivre [19] avaient déjà noté l'absence de relation entre les performances des souches en conditions usuelles et leur sen-

sibilité à un report de longue durée à basse température (conservation des fromages à 2 °C pendant 3 mois avant l'affinage). Au cours de la présente étude, aucune relation entre la sensibilité au report et la sensibilité au sel n'a été enregistrée (résultat non montré). Selon Hofherr et al. [12], certaines souches de *P. freudenreichii* acquièrent une résistance aux basses températures en modifiant la composition lipidique de leur membrane. L'acquisition de la résistance à ces deux facteurs de stress apparaissant indépendante, la résistance au sel serait plutôt imputable à l'accumulation d'osmoprotecteurs. Deborde et al. [8] ont également émis l'hypothèse que *Propionibacterium freudenreichii* pourrait accumuler de tels osmoprotecteurs (tréhalose, glycine-bétaïne, proline) dans des conditions d' a_w défavorables. Ces auteurs ont ainsi démontré la production de tréhalose par *P. freudenreichii*.

L'augmentation du rapport S/M de 1 % à 2 % provoque une utilisation accrue du lactate D(-) par les souches de *P. freudenreichii*. Selon les souches, la consommation relative de cet énantiomère peut être doublée. Schilliger-Devriendt [22] avait déjà observé un phénomène similaire chez *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. L'activité des systèmes de transport et d'oxydation du lactate D(-) étaient beaucoup moins affectés par de faibles températures (0-2 °C) que ceux du lactate L(+).

Dans l'emmental, un rapport S/M de 2 % est observé à une profondeur comprise entre 2 et 5 cm au talon entre 15 et 30 j d'affinage, et à une profondeur de 5-8 cm entre 45 et 60 j [5]. A mi-rayon, la zone comprise entre 2 et 5 cm de profondeur présente un S/M de 2 % entre 30 et 60 j d'affinage. Un rapport S/M voisin de 3 % concerne la zone 0-2 cm pendant tout l'affinage au talon et jusqu'à 30 j à mi-rayon. Au talon, la zone 2-5 cm de profondeur atteint cette valeur entre 30 et 60 j d'affinage.

Seules les souches résistant à 2 % (voire 3 %) de S/M s'avèrent donc capables de produire une fermentation homogène dans la meule. Même si la localisation des yeux est indépendante du lieu de formation du CO₂ [24], une fermentation intense en zone sous-croûte peut réduire la fréquence de certains défauts comme le défaut « bande de lard » (absence d'ouverture dans les cinq premiers cm).

À l'inverse, il sera possible de choisir des souches sensibles au sel pour ralentir voire arrêter la fermentation propionique lors de la diffusion du sel vers l'intérieur de la meule. Le choix de telles souches permettrait d'améliorer la conservation de l'emmental. Une telle utilisation ne peut être envisagée avec succès que si les bactéries propioniques indigènes du lait ne sont pas plus halotolérantes que les souchesensemencées. Dans le cas contraire, le développement des souches du lait pourrait provoquer des fermentations secondaires ou l'apparition de points bruns correspondant à des macrocolonies de *P. freundenreichii* [1].

Des souches sensibles au NaCl pourraient également être utilisées pour d'autres fromages comme le Saint-Nectaire [16] ou l'Abondance (ITG, non publié), où une production d'acides gras volatils sans ouverture importante peut être recherchée.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par la Région Bretagne. Les auteurs remercient les membres du laboratoire central de l'ITG à Mamirolle, pour la réalisation des analyses physico-chimiques.

RÉFÉRENCES

- [1] Baer A., Ryba I., Grand M., Ursachen der Entstehung von braunen Tupfen im Käse, Schweiz Milchw. Forsch. 22 (1993) 3-7.
- [2] Berdagué J.L., Méthode d'extraction rapide des acides gras volatils dans les fromages, Lait 66 (1986) 233-246.
- [3] Bergère J.L., Tourneur C., Les bactéries de surface des fromages, In: Hermier J., Lenoir J., Weber F. (eds), Les groupes microbiens d'intérêt laitier, CEPIL, Paris, 1992, pp. 127-163.
- [4] Carcano M., Todesco R., Lodi R., Brasca M., Propionibacteria in Italian hard cheeses, Lait 75 (1995) 415-426.
- [5] Chamba J.F., Le salage de l'emmental : étude de l'absorption, de la migration, de la répartition du sel et de son influence sur la qualité du fromage, thèse de l'université de Nancy, 1982, 221 pp.
- [6] Chamba J.F., Memento pâte cuite, in: Parlons fromagerie, 153, ITG, Rennes, France, 1993.
- [7] Crow K.L., Turner K.W., The effect of succinate production on other fermentation products in swiss type cheese, N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 21 (1986) 217-227.
- [8] Deborde C., Corre C., Rolin D.B., Nadal L., de Certaines J.D., Boyaval P., Trehalose biosynthesis in dairy *Propionibacterium*, J. Magn. Reson. Anal. 2, 297-304.
- [9] Grappin R., Lefier D., Dasen A., Pochet S., Characterizing ripening of Gruyère de Comté : influence of time x temperature and salting conditions on eyes and split formation, Int. Dairy J. 3 (1993) 313-328.
- [10] Gudkov A.V., Cheeses of the former USSR. In: Fox P.F. (ed.), Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 2, 2nd edn, Chapman & Hall, Londres, 1993.
- [11] Guinee T.P., Fox P.F., Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects, in: Fox P.F. (ed.), Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 1, 2nd edn, Chapman & Hall, Londres, 1993.
- [12] Hofherr L.A., Hammond E.G., Glatz B., Ross P.F., Relation of growth temperature to fatty acid composition of *Propionibacterium* strains, J. Dairy Sci. 66 (1983) 1622-1629.
- [13] Hollywood N.W., Doelle H.W., The effect of sampling position and age on levels of propionibacteria and flavor related compounds in Swiss-type cheese, Aust. J. Dairy Technol. 39 (1984) 80-82.
- [14] Januel M., La fermentation propionique de l'emmental. Mémoire ENILV/ITG La Rochesur-Foron, France, 1978.
- [15] Langsrud T., Reinbold G.W., Flavor development and microbiology of Swiss-cheese. A review. III. Ripening and flavor production, J. Milk Food Technol. 36 (1973) 593-609.
- [16] Mayenobe D., Didenne R., Pradel G., Caractérisation des gonflements tardifs dans les fromages de Saint-Nectaire et certaines pâtes pressées, Lait 63 (1983) 15-24.

- [17] Mesclé J.F., Zucca J., Le comportement des microorganismes en milieu alimentaire. In : Bougeois C.M., Mesclé J.F., Zucca J., (eds), Microbiologie alimentaire. 1. Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité agroalimentaire, APRIA, Paris, 1988.
- [18] Naud A.I., Legault-Demarre J., Ryter A., Induction of a stable morphological change in *Propionibacterium freudenreichii*, J. Gen. Microbiol. 134 (1988) 283-293.
- [19] Richoux R., Faivre E., Technological properties of pure propionibacteria strains : test in Swiss-type mini-cheese. XXIV^e Congr. Int. Lait Melbourne, Brief Communications, Gc39, 252, 1994.
- [20] Richoux R., Kerjean J.R., Caractérisation technologique de souches pures de bactéries propioniques : test en minifabrication de fromages à pâte cuite, Lait 75 (1995) 45-59.
- [21] Ruegg M., Glättli H., Blanc B., Einfluss des Wasseraktivität auf Vermehrung und Stoffwechsel von Propionsäurebakterien, Schweiz Milchforsch. 5 (1976) 119-122.
- [22] Schilliger-Devriend C., Transport et oxydation du D- et du L-lactate chez *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, Thèse de doctorat, université des sciences de Lausanne, 1985 161 pp.
- [23] Stadhouders J., Microbes in milk and dairy products. An ecological approach, Neth. Milk Dairy J. 29 (1975) 104-126.
- [24] Steffen C., Eberhard P., Bosset J.O., Ruegg M., Swiss varieties, In : Fox F.P., (ed), Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol 2, 2nd edn, Chapman & Hall, Londres, 1993.
- [25] Streit K., Ruegg M., Blanc B., Beeinflussung des Wachstums von Milsäure - und Propionsäure-Bakterien durch die Wasseraktivität in Abhängigkeit des Zusatzes zum Nährmedium, Milchwissenschaft 34 (1979) 459-462.
- [26] Thierry A., Madec M.N., Richoux R., Croissance des bactéries propioniques dans le fromage : comparaison de 2 milieux de dénombrement, Lait 74 (1994) 161-171.