

## Probiotiques, bactéries probiotiques, levains

### Les bactéries propioniques laitières

M Gautier, S Lortal, P Boyaval, F Girard, R Lemée,  
AF de Carvalho, C Dupuis

*Laboratoire de recherches de technologie laitière, INRA, 65, rue de St-Brieuc,  
35042 Rennes Cedex, France*

**Résumé** — L'emploi des bactéries propioniques lors de la fabrication des fromages à pâtes pressées cuites est actuellement mal maîtrisé. Les exigences grandissantes de l'industrie fromagère (en matière de standardisation des procédés) soulèvent d'intéressantes questions concernant l'identification et les réelles propriétés technologiques (modes d'intervention dans l'affinage) des levains propioniques. Cette revue, non exhaustive, présente les résultats obtenus récemment sur l'identification phénotypique et génotypique des espèces ainsi que sur la différenciation des souches. Certaines avancées significatives dans des domaines susceptibles d'avoir des répercussions technologiques sont présentées: activités protéolytiques et autolytiques des bactéries propioniques, production en fermenteur d'acide propionique, mise en évidence de bactériophages infectant *P freudenreichii* (principale espèce utilisée comme levain en fromagerie).

***Propionibacterium spp* / identification / taxonomie / protéolyse / autolyse / bactériophage / fromage / acide propionique**

**Summary** — **Dairy propionic acid bacteria.** *Propionic acid bacteria are used in Swiss type cheese technology without real control. The increasing demands of the cheese industry as regards standardisation of processes raise interesting questions about the identification and the accurate technological properties of propionic starters. The results obtained recently on phenotypical and genotypical identification of dairy propionic species as well as a means of differentiation between strains are presented in this non exhaustive review. Moreover, some observations relating to the technological use of propionic acid bacteria have been summarized: proteolytic activity, autolysis, propionic acid production and first observation of a bacteriophage infecting *P freudenreichii*.*

***Propionibacterium spp* / identification / taxonomy / proteolysis / autolysis / bacteriophage / cheese / propionic acid**

## INTRODUCTION

Les bactéries propioniques laitières sont les principaux agents de l'affinage des fromages à pâtes pressées cuites, type Emmental. Elles participent au développement de l'ouverture et de la saveur caractéristiques de ces fromages. En fin d'affinage la population propionique atteint  $10^9$  bactéries/g de pâte (Hettinga et Reinbold, 1972; Langsrud et Reinbold, 1973a, b). Elles sont aussi utilisées pour la production d'acide propionique dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire. Enfin, en tant que bactéries «alimentaires», elles sont intéressantes pour la production de vitamine B12 (Yongsmith *et al*, 1982; Marwaha *et al*, 1983). L'utilisation de ces microorganismes en technologie fromagère est assez mal maîtrisée, c'est pourquoi depuis une dizaine d'années, leur étude est devenue la thématique principale de plusieurs équipes (Britz et Riedel, 1991; Glatz, 1992; Gautier *et al*, 1992a, b). Après avoir présenté les principales caractéristiques des bactéries propioniques laitières, cette revue non exhaustive expose les résultats les plus récents obtenus dans les domaines suivants : taxonomie, étude de leurs rôles en technologie fromagère, production de métabolites en fermenteur et développement d'outils pour l'amélioration génétique des souches.

### Principales caractéristiques

Les bactéries propioniques laitières appartiennent au genre *Propionibacterium* et sont décrites dans le *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath *et al*, 1986) comme étant des «bâtonnets irréguliers, Gram positifs, non sporulés» (fig 1). Étant classées parmi les actinomycètes, ces bactéries sont phylogénétiquement

éloignées des bactéries lactiques. Leur GC% est élevé et varie de 64 à 68% selon les espèces (Johnson et Cummins, 1972). Elles sont pléiomorphes : leurs forme et taille varient selon les souches et les conditions de croissance. Ces bactéries se cultivent en anaérobiose. Leur temps de génération est élevé, 7 h à 10 h suivant les souches sur milieu au lactate de sodium (YEL) (Hettinga *et al*, 1968), et 5 à 10 j sont nécessaires pour obtenir des colonies sur le milieu gélosé YEL. Elles sont mésophiles, leur optimum de croissance se situe entre 25 et 35 °C; cependant, certaines souches sont capables de se développer à 4 °C (Britz et Steyn, 1980) et peuvent ainsi, lors de la conservation des fromages de report stockés au froid, accroître l'ouverture des pâtes fromagères par une production de CO<sub>2</sub> tardive. La plupart des souches sont thermorésistantes (Britz et Steyn, 1980); elles survivent aux traitements de pasteurisation HTST (72 °C; 15 s). La thermisation (60–63 °C; 2–10 s) appliquée au lait destiné à la fabrication des Emmentals ne détruit donc pas les souches sauvages qui se développent durant l'affinage. Les bactéries propioniques se caractérisent aussi par leurs voies fermentaires qui, à partir de nombreux substrats carbonés comme le lactate produit



Fig 1. Microscopie électronique à balayage (x 6000) de la souche *Propionibacterium freudenreichii* subsp *shermanii* CIP103027.

par les bactéries lactiques, conduit à la production d'acides gras volatils tels que les acides propionique et acétique (Steffen *et al*, 1987). Une des originalités de ce métabolisme est la production et l'utilisation de vitamine B12 comme coenzyme lors de la production d'acide propionique (Wood, 1981).

### Taxonomie

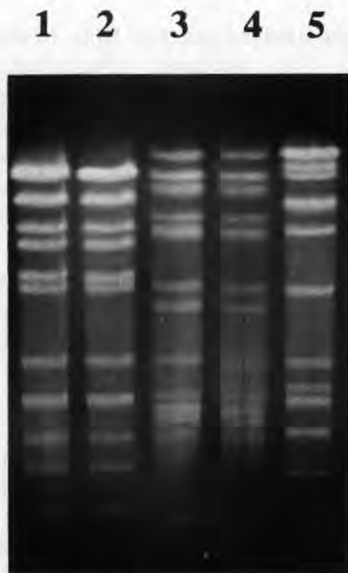
Le genre *Propionibacterium* comprend d'une part des espèces commensales de l'homme dont certaines sont impliquées dans la pathologie de l'acné (Sneath *et al*, 1986) et d'autre part 4 espèces intervenant en technologie fromagère (tableau I), la plus utilisée en tant que levain étant *P freudenreichii*. Une première classification des espèces par hybridation ADN/ADN a montré que ce genre était homogène et a permis de regrouper la vingtaine d'espèces laitières répertoriées depuis le début du siècle parmi les 4 existant actuellement (Johnson et Cummins, 1972). Une étude similaire, mais utilisant la taxonomie numérique, réalisée sur 78 souches a été

effectuée récemment par Britz et Riedel (1991). Les relations phylogénétiques entre ces espèces ont été déterminées grâce à la comparaison des séquences de l'ARN 16S (Charfreitag et Stackebrandt, 1989) et montrent que *P freudenreichii* forme un groupe à part parmi les espèces laitières.

La détermination des espèces et la différenciation des souches reposent actuellement sur l'observation des caractères phénotypiques et plus spécialement sur l'étude du spectre de fermentation des sucres. En raison de la variabilité des souches, ces techniques se révèlent insatisfaisantes. Pour résoudre ce problème, Baer et Ryba (1991) ont proposé une méthode d'identification des espèces par électrophorèse des protéines et *Immunoblotting*. En collaboration avec l'Institut Pasteur, nous nous sommes orientés vers des méthodes génétiques, et en particulier le ribotypage (comparaison des profils de restriction des gènes codant pour l'ARN ribosomique) (Grimont et Grimont, 1986). L'obtention d'un bon matériel d'étude était un préalable nécessaire. Soixante dix souches de notre collection ont donc été auparavant classées parmi les 4 espèces laitières par hybridation ADN/ADN et détermination du  $\Delta T_m$ . Certaines souches sont en cours de reclassement parmi une autre espèce, d'autres, n'appartenant pas au genre *Propionibacterium* ont ainsi été éliminées, (AF de Carvalho, communication personnelle). Enfin, le ribotypage a permis de différencier les 4 espèces de bactéries propioniques laitières (AF de Carvalho *et al*, résultats non publiés). Afin de différencier les souches entre elles, une autre approche a été utilisée : la comparaison du profil de restriction du chromosome obtenu par migration en électrophorèse en champs pulsés. Cette technique, permettant la détection des souches identiques (fig 2) nous a ainsi permis d'évaluer la diversité de notre collection.

**Tableau I.** Différentes espèces du genre *Propionibacterium*.

Espèce laitières	Espèces commensales
<i>P freudenreichii</i> subsp <i>freudenreichii</i>	<i>P acnes</i>
<i>P freudenreichii</i> subsp <i>shermanii</i>	<i>P granulorum</i>
<i>P jensenii</i>	<i>P avidum</i>
<i>P thoenii</i>	<i>P lymphophilum</i>
<i>P acidipropionici</i>	<i>P propionicus</i>



**Fig 2.** PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) de l'ADN chromosomique (digéré par XbaI) de plusieurs souches industrielles de *Propionibacterium freudenreichii* isolées à partir de différents levains. Les souches 1 et 2 sont identiques; les souches 3 et 4 sont identiques.

## RÔLES EN TECHNOLOGIE FROMAGÈRE

Il est difficile de déterminer exactement le rôle d'une flore d'affinage car elle intervient sur un produit considérablement modifié par les bactéries l'ayant précédée, et elle interagit avec d'autres micro-organismes. On peut cependant dire que les bactéries propioniques sont en grande partie responsables de l'ouverture des Emmentals, ainsi que de leur saveur caractéristique (Langsrud et Reinbold, 1973a, b).

### Rôle dans l'ouverture

La formation des «yeux» est un phénomène mal connu, car on ne possède pas de technique suffisamment sensible pour me-

surer finement l'apparition de CO<sub>2</sub> au sein des fromages. Le CO<sub>2</sub> est produit par l'action conjuguée des bactéries propioniques (40%) et des bactéries hétérofermentaires. Dans un Emmental de 75 kg, 125 l de CO<sub>2</sub> sont produits : 48% sous forme dissoute dans la pâte, 20% dans les yeux et 32% diffusés dans l'atmosphère (Flückiger et Walser, 1980). La qualité de l'ouverture (taille, répartition et nombre des yeux) est cependant difficile à maîtriser. La quantité de gaz produit est vraisemblablement variable suivant les voies fermentaires utilisées par les bactéries. De plus, la qualité de l'ouverture dépend de la texture de la pâte, donc de son degré de protéolyse et de lipolyse et par conséquent de l'activité antérieure de la flore lactique (Rousseau et Le Gallo, 1990).

### Rôle dans la production d'arômes

Il est définitivement acquis que les acides gras volatils tels que les acides propionique et acétique participent grandement à l'arôme spécifique des Emmentals (Langsrud et Reinbold, 1973a, b; Martins, 1985). Il existe peu de travaux quant à la production par *Propionibacterium* de molécules issues du catabolisme des lipides et des acides gras; certains auteurs ont cependant montré l'existence de lipases et d'estérases chez ces bactéries (Oterholm *et al*, 1970). Par ailleurs, on sait que la production microbienne de peptides et d'acides aminés libres, ainsi que les produits de leur catabolisme, interviennent dans la saveur des fromages (Steffen *et al*, 1987). Les bactéries propioniques sont habituellement considérées comme étant peu ou pas protéolytiques (Langsrud *et al*, 1977; Floberghagen et Langsrud, 1978; Perez Chaia *et al*, 1988a). Cependant, nous avons démontré l'existence d'une faible activité protéasique (sur la caséine  $\beta$ ) chez les 4 espèces lactières de *Propionibacterium* (C Dupuis, communication personnelle). En revanche,

de fortes activités aminopeptidasiques intracellulaires ont été observées au laboratoire chez les 4 espèces, et une proline imino-peptidase a été caractérisée (Panon, 1990). La présence d'enzymes intracellulaires nous a incité à étudier le système autolytique de *Propionibacterium*. Huit souches de notre collection ont été sélectionnées pour leur capacité à s'autolyser rapidement. L'une d'entre elles, appartenant à l'espèce *P. freudenreichii*, est actuellement utilisée comme modèle d'étude. La lyse cellulaire est provoquée par des autolysines qui hydrolysent spécifiquement le peptidoglycane (Rogers *et al*, 1980). Une autolysine de type glycosidase a ainsi été mise en évidence, et sa purification est en cours (R Lemée, communication personnelle).

## PRODUCTION D'ACIDE PROPIONIQUE

L'acide propionique, principal métabolite excrété par ces bactéries, intervient dans la fabrication de nombreux produits en tant qu'antifongique, pour la synthèse de thermoplastique, comme base de solvant, en cosmétologie, etc. (Playne, 1985). Nos travaux (Boyaval et Corre, 1987) sur la production d'acide propionique en réacteur à membrane ont permis le développement d'un procédé original (Boyaval *et al*, 1991). Les produits issus de ce procédé sont employés comme bases aromatiques ainsi qu'en tant que conservateur naturel pour les fromages (Hervé *et al*, 1992) et autres produits alimentaires.

## DÉVELOPPEMENT D'OUTILS POUR L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE *PROPIONIBACTERIUM*

### *Connaissance du génome*

Très peu de gènes chromosomiques des bactéries propioniques ont été isolés et

étudiés. Seuls à notre connaissance l'ont été : l'opéron transcarboxylase cloné chez *E. coli* et dont la séquence a été établie (Murtif *et al*, 1985; Samols *et al*, 1988) ainsi que les gènes codant pour l'adénosylcobalamine-dépendante méthylmalonyl CoA mutase de *P. shermanii* (Marsh *et al*, 1989). De plus, aucun gène plasmidique n'a été étudié : ces bactéries présentent peu de plasmides (environ 10% des souches en possèdent 1 à 3 de tailles variant de 9 kb à 35 kb) et les expériences de cure ont à notre connaissance échoué quant à la mise en évidence de leurs rôles (Perez Chaia *et al*, 1988b; Rehberger et Glatz, 1990; Gautier, résultats non publiés). Par ailleurs la taille du chromosome des bactéries propioniques laitières a pu être estimée. Elle varie selon les espèces de 2 300 à 3 200 kb (Gautier *et al*, 1992a).

### *Transfert d'ADN chez Propionibacterium*

En raison de l'absence de marqueur génétique aisément transférable chez ces bactéries, aucune méthode de transfert n'a pu être développée jusqu'à maintenant. On peut noter toutefois le transfert du pGK12 par Luchansky (1988) à très basse fréquence dans une souche de *P. freudenreichii*. Les essais réalisés dans notre laboratoire avec ce vecteur ainsi qu'avec d'autres vecteurs utilisés chez les bactéries lactiques se sont soldés par des échecs. L'utilisation de vecteurs employés chez des genres bactériens proches de *Propionibacterium* tels que *Streptomyces* ou *Corynebacterium* devrait s'avérer plus prometteuse. La récente découverte d'un bactériophage infectant *P. freudenreichii* (Gautier *et al*, 1992b) devrait nous permettre de mettre au point les paramètres de l'électrotransfection chez la souche TL10 sensible au phage.

## CONCLUSION

L'évolution des conditions de production et de collecte du lait entraîne un appauvrissement inéluctable du contenu en germes propioniques du lait arrivant aux usines laitières. L'élaboration de levains propioniques parfaitement caractérisés tant du point de vue taxonomique que technologique est déjà et sera encore plus demain, une exigence de l'industrie fromagère. Grâce à l'emploi des méthodologies taxonomiques basées sur la biologie moléculaire, la collection constituée au sein de notre laboratoire constitue un matériel d'études déjà bien caractérisé sur le plan génomique. Il nous reste à la caractériser complètement au plan technologique : production d'acides propionique et acétique, production de CO<sub>2</sub>, activités enzymatiques, etc. en conditions de transformation fromagère. Cela signifie l'obligation d'acquérir parallèlement une connaissance approfondie des voies métaboliques de ce genre bactérien et des relations d'interactions existant avec les autres espèces bactériennes présentes dans le milieu fromage (bactéries lactiques notamment). De telles études requièrent l'élaboration de méthodes d'identification et de suivi utilisables en contexte industriel. Des actions de recherches devraient être menées dans ce sens, pour développer des techniques à réponse rapide basées par exemple sur la sérologie ou la biologie moléculaire.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier pour leur précieuse aide technique C Corre, S Guezenc, MN Madec et A Rouault. Les travaux menés à l'INRA de Rennes sont soutenus par la région Bretagne.

## RÉFÉRENCES

- Baer A, Ryba I (1991) Identification of propionibacteria and streptococci by immunoblotting. *Milchwissenschaft* 45, 292-294
- Boyaval P, Corre C (1987) Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle. *Biotechnol Lett* 9, 801-806
- Boyaval P, Colomban A, Roger L (1991) Procédé et dispositif de fermentation semi-continue, notamment pour la fabrication industrielle d'un mélange biologique à base d'acide propionique. Brevet européen 0 452 240 A 1
- Britz TJ, Steyn PL (1980) Comparative studies on propionic acid bacteria. *Phytophactica* 12, 89-103
- Britz TJ, Riedel KHJ (1991) A numerical taxonomic study of *Propionibacterium* strains from dairy sources. *J Appl Bacteriol* 71, 407-416
- Charfreitag O, Stackebrandt E (1989) Inter- and intrageneric relationships of the genus *Propionibacterium* as determined by 16S rRNA sequences. *J Gen Microbiol* 135, 2065-2070
- Floberghagen V, Langsrud T (1978) Peptide hydrolases in propionibacteria. *20th Int Dairy Congr*, 477-478
- Flückiger E, Walser F (1980) CO<sub>2</sub> und lochbildung in Emmentalerkäse. *Schweiz Milchztg* 109, 473-480
- Gautier M, Rouault A, Lortal S, Leloir Y, Patureau D (1992a) Characterization of a phage infecting *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait* 72, 431-435
- Gautier M, Mouchel N, Rouault A, Sanséau P (1992b) Determination of genome size of 4 *Propionibacterium* species by pulsed-field gel electrophoresis. *Lait* 72, 421-426
- Glatz BA (1992) The classical propionibacteria: their past, present, and future as industrial organisms. *ASM News* 58, 197-201
- Grimont F, Grimont PAD (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137B, 165-175
- Hervé M, Efstathiou T, Quiblier JP, Méjean S (1992) Un conservateur naturel pour les fromages à pâte pressée. *Process* 1069, 24-29

- Hettinga DH, Reinbold GW (1972) The propionic acid bacteria, a review. *J Milk Food Technol* 35, 295-301, 358-372, 436-447
- Hettinga DH, Vedamuthu ER, Reinbold GW (1968) Pouch method for isolating and enumerating propionibacteria. *J Dairy Sci* 51, 1707-1709
- Johnson JL, Cummins CS (1972) Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. *J Bacteriol* 109, 1047-1066
- Langsrud T, Reinbold GW (1973a) Flavor development and microbiology of Swiss cheese—A review. II. Starters, manufacturing process and procedures. *J Milk Food Technol* 36, 531-542
- Langsrud T, Reinbold GW (1973b) Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review. III. Ripening and flavor production. *J Milk Food Technol* 36, 593-609
- Langsrud T, Reinbold GW, Hammond EG (1977) Proline production by *Propionibacterium shermanii* P-59. *J Dairy Sci* 60, 16
- Luchansky JB, Muriana PM, Klaenhammer TR (1988) Application of electroporation for transfer of plasmidic DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol Microbiol* 2, 637-646
- Marsh EN, McKie N, Davis NK, Leadlay PF (1989) Cloning and structural characterization of the genes coding for adenosylcobalamin-dependent methymalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 260, 345-352
- Martins JFP (1985) The utilization of *Propionibacterium* and cheese quality. *Rev Inst Lactincios Candido Tostes* 40, 3-17
- Marwaha SS, Sethi RP, Rennedy JF, Kumar R (1983) Simulation of fermentation conditions for vitamin B12 biosynthesis from whey. *Enzyme Microb Technol* 5, 449-453
- Murtif VL, Bahler CR, Samols D (1985) Cloning and expression of the 1,3 S biotin-containing subunit of transcarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 5617-5621
- Oterholm A, Ordal ZJ, Witter LD (1970) Purification and properties of a glycerol ester hydrolase from *Propionibacterium shermanii*. *Appl Microbiol* 20, 16-22
- Panon G (1990) Purification and characterization of a proline iminopeptidase from *Propionibacterium shermanii* 13673. *Lait* 70, 439-452
- Perez Chaia A, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G (1988a) Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of *Propionibacteria*. *Microbiol Alimentos Nutr* 6, 91-94
- Perez Chaia A, Sesma F, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G (1988b) Screening of plasmids in strains of *Propionibacterium* and mesophilic lactobacilli isolated from Swiss type cheeses. *Microbiol Alimentos Nutr* 6, 171-174
- Playne MJ (1985) Propionic and butyric acids. In: *Comprehensive biotechnology*, vol 3 (Moo-Young M, ed). Pergamon Press, Oxford
- Rousseau M, Le Gallo C (1990) Étude de la structure de l'Emmental au cours de la fabrication par la technique de microscopie électronique à balayage. *Lait* 70, 55-66
- Rehberger T, Glatz BA (1990) Characterization of *Propionibacterium* plasmids. *Appl Environ Microbiol* 57, 701-706
- Rogers HL, Perkins HR, Ward JB (1980) *Microbial cell walls and membranes*. Chapman and Hall, London
- Samols D, Thornton C, Nurtif VL, Kumar GK, Haase C, Wood HG (1988) Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J Biol Chem* 263, 6461-6464
- Sneath PHA, Mair NS, Holt JG (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1350-1353
- Steffen C, Flueckiger, Bosset JO, Ruegg M (1987) Swiss type varieties. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol 2 (Fox PF, ed) Elsevier Applied Science, London
- Wood HG (1981) Metabolic cycles in the fermentation by propionic acid bacteria. *Curr Top Cell Regul* 18, 255-287
- Yongsmith B, Sonomoto K, Tanaka S, Fukui S (1982) Production of vitamin B12 by immobilised cells of a propionic acid bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol* 16, 70-74