

Comparaison des paramètres de croissance en milieux solides et liquides de *Geotrichum candidum* Geo17 et *Penicillium camemberti* LV2

A Amrane, Y Prigent

Laboratoire des procédés de séparation, Université de Rennes I (unité associée Inra),
IUT, département Chimie, BP 1144, 35014 Rennes cedex, France

(Reçu le 10 décembre 1996 ; accepté le 30 avril 1997)

Summary — **Comparison of growth parameters for *Geotrichum candidum* Geo17 and *Penicillium camemberti* LV2 in solid and liquid cultures.** The main purpose of this paper was to compare the growth of filamentous fungi in a lactate and yeast extract medium on solid and in submerged pure cultures. The organisms used were *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti*: both were known to play an important role in ripening of camembert cheese. Fungal growth on the surface of a uniformly inoculated solid medium was measured by means of dry cellular weight per surface unit. For submerged cultures, total biomass concentration was continuously monitored by means of turbidity, after calibration with respect to dry cellular weight concentration. Both fungi displayed a long linear growth phase, on solid as well as in weakly aerated submerged cultures; the ratios of the linear growth rates (solid/liquid) observed for both moulds were the same within the experimental error; this clearly showed that for both culture methods the limiting substrate was oxygen. Both organisms displayed approximatively the same autolysis extent on solid medium (24–28%) 4 days after the end of linear growth phase.

growth / *G candidum* / *P camemberti*

Résumé — Le but principal du présent travail est de comparer la croissance de champignons filamenteux dans un même milieu modèle (lactate + extrait de levure), gélifié ou non ; les deux moisissures étudiées, *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti*, jouent toutes deux un rôle important dans l'affinage des fromage à pâte molle et croûte fleurie de type camembert. La croissance dans un gel uniformément ensemencé est mesurée par la masse cellulaire sèche par unité de surface. En phase submergée, la concentration en biomasse totale est mesurée en continu par turbidimétrie, après un calibrage par rapport à la masse sèche cellulaire par unité de volume. Pour les deux moisissures, on observe sur solide et en culture submergée peu aérée une longue phase de croissance linéaire ; aux erreurs d'expérience près, les rapports des vitesses de croissance linéaires en milieux solide et liquide des deux espèces sont égaux. Cela montre que, pour les deux modes de culture étudiés, le nutriment limitant est l'oxygène. Quatre jours après la fin de la phase linéaire de croissance sur milieu solide, les deux micro-organismes sont autolysés à peu près dans les mêmes proportions (24–28 %).

croissance / *G candidum* / *P camemberti*

INTRODUCTION

Dans l'affinage des fromages à pâte molle et croûte fleurie de type camembert, interviennent entre autres espèces, les deux moisissures *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti*. La maîtrise de l'affinage et l'amélioration de la qualité des produits finis dépendent de la maîtrise de la croissance de ces deux moisissures, et en particulier de l'équilibre des deux populations (Mourgues et al, 1983).

Pour ce qui est de la croissance sur milieux nutritifs classiques (source de carbone et d'énergie : lactose, lactate ou glucose ; source d'azote : peptones ou ammoniacque), la bibliographie est beaucoup plus abondante pour *G candidum* que pour *P camemberti*.

En ce qui concerne le champignon levuriforme *G candidum*, de telles études ont été menées tant sur milieux gélifiés (Fiddy et Trinci, 1975) qu'en culture submergée (Trinci et Collinge, 1974) : dans le premier cas, la croissance radiale était suivie par l'augmentation du diamètre du thalle, et dans le second cas, la biomasse totale était mesurée par la turbidité du milieu, étalonnée par rapport à la concentration en masse cellulaire sèche. Des cultures continues ont permis de montrer que l'induction des arthrospores se fait principalement à vitesse spécifique de croissance faible ; les cellules obtenues dans ces conditions sont plus longues que celles formées à taux de dilution élevé (Robinson et Smith, 1976). D'autre part, une limitation en oxygène amène un allongement de la cellule apicale quand le milieu est assez concentré, et l'absence de branchement (Robinson et Griffith, 1977).

De nombreux articles traitent des activités protéolytiques et lipolytiques de *P camemberti*, qui jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages à pâte molle et à croûte fleurie : l'équipe de Lenoir (1984), qui a beaucoup contribué dans ce domaine, a analysé en détail la bibliogra-

phie correspondante. Mais à l'heure actuelle, la croissance de *P camemberti* semble avoir donné lieu à beaucoup moins d'études ; cela est probablement dû au fait que le dénombrement de champignons filamenteux pose beaucoup de problèmes (Jarvis et al, 1983) ; dans cet ordre d'idée, il est intéressant de noter que dans un article récent de Bockelmann et al (1996), traitant de la culture et de la sporulation de *P camemberti* en fermenteur de 10 L, on ne trouve aucune information quantitative sur la croissance.

Récemment, des méthodes de suivi de la croissance des deux espèces pures ou en association sur milieu modèle liquide et sur camembert en cours d'affinage ont été mises au point (Molimard et al, 1995) ; elles sont fondées sur le dénombrement en milieux sélectifs d'unités formant colonies (ufc) après homogénéisation dans des conditions bien normalisées. Il est probable que ce type de détermination soit le seul praticable pour des cultures mixtes, mais on sait que de tels dénombrements sont peu précis et nécessitent de nombreuses répétitions pour obtenir des erreurs standards acceptables ; de plus, dans l'article précité, les milieux liquides et solides étaient différents : il était donc impossible de relier entre elles les deux séries de résultats.

L'objet de cet article est de présenter d'autres méthodes d'évaluation rapide (sous forme de la biomasse totale) de la croissance de *G candidum* et *P camemberti* en cultures pures, applicables tant à des milieux gélifiés que liquides ; comme ces milieux sont de compositions très voisines, on tentera d'identifier, dans les deux cas, les facteurs limitant la croissance.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches

Nous avons retenu, pour leur intérêt fromager, les souches de *Geotrichum candidum* 17 et *Penicillium camemberti* LV2 (Texel, Dangé Saint-

Romain, France), stockées à +7 °C sous forme de spores lyophilisées. La turbidité d'une suspension de spores dans de l'eau distillée stérile est mesurée en cuve de 1 cm à $\lambda = 600$ nm. La viabilité des spores est contrôlée périodiquement : le nombre total de spores dans un volume donné de suspension est mesuré à l'aide d'une lame de Thoma, et le nombre de spores viables correspondant est déterminé à partir d'une série de dilutions décimales dans un milieu gélosé à l'extrait de malt et de levure reconstitué à 38 g L⁻¹ (Yeast-Malt extract, Difco, Detroit, MI, États-Unis), en boîte de Pétri, au bout de 3 jours à 20 °C.

Composition des milieux de culture

Liquide : DL lactate de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne) 10 g L⁻¹, extrait de levure (Biokar, Pantin, France) 10 g L⁻¹, pH ajusté à 4,5.

Solide : DL lactate de calcium (Prolabo, Paris, France) 10 g L⁻¹, extrait de levure 10 g L⁻¹, agarose type E (Biokar) 25 g L⁻¹, pH ajusté à 7,0.

Cultures sur milieux solides

Une quantité de 500 mL de milieu stérile maintenu en surfusion à 48 °C est déposée dans une boîte de Pétri en verre stérile de diamètre intérieur 185 mm ; après refroidissement, la surface du gel estensemencée uniformément par 15 mL de suspension titrée de spores dans de l'eau distillée stérile (2 à 3 10⁷ spores / mL). Toutes les 24 heures, on prélève aseptiquement, à l'aide d'un emporte-pièce stérile, deux carottes de 11 mm de diamètre. De chacune d'entre elles, on détache la pellicule constituant la biomasse : une des pellicules est séchée (2 h 15 min sous une lampe IR de 250 W) dans une coupelle d'aluminium pour la détermination de la masse cellulaire sèche ; la seconde pellicule est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, et homogénéisée 60 s dans 0,7 mL d'eau distillée, à l'aide d'un Piston Pellet (Bioblock, Illkirch, France) : la turbidité de la suspension homogénéisée est mesurée à $\lambda = 600$ nm après dilution.

Culture en milieux liquides

Une quantité de 300 mL de milieu est stérilisée dans un fermenteur de 500 mL. La température

est fixée à 25 °C par circulation d'eau thermostatée dans la double enveloppe. L'aération est réglée à 1,67 L h⁻¹ (soit 0,093 vvm), et l'agitation magnétique à 800 tours/min, de façon à éviter la formation de pelotes. L'ensemencement est réalisé par addition aseptique de 1 mL de suspension titrée de spores (2-3 10⁸ / mL). Le fermenteur est équipé d'une boucle de circulation stérile permettant d'enregistrer en continu la turbidité du milieu ($\lambda = 650$ nm) au moyen d'un appareil spécialement adapté au cas des champignons filamenteux, et réalisé au laboratoire. La turbidité est convertie en masse cellulaire sèche après un calibrage préalable.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Titration de suspension de spores et normalisation de l'inoculum

La figure 1 montre que la relation entre turbidité et concentration en masse sèche de spores de *G candidum* et *P camemberti* est linéaire jusqu'à 1,1 et 1,7 g L⁻¹ respectivement. Selon Mallette (1969), à concentrations massiques identiques, les plus grosses particules diffusent plus la lumière ; la théorie est bien confirmée par les résultats du tableau I, puisque le rapport A/x le plus grand est obtenu pour les spores les plus grosses, celles de *G candidum*. On notera enfin que pour les échantillons à notre disposition, et sans que l'on puisse tirer de règle générale, la viabilité des arthrospores est beaucoup plus faible que celle des conidiospores. Lorsque le taux de viabilité des spores au moment de l'emploi est connu, les résultats du tableau I permettent, au moyen d'une simple mesure de turbidité, de préparer facilement un inoculum titré en spores viables.

Cultures sur milieux solides

Après une phase de latence de 2 jours, les deux moisissures croissent linéairement sur milieu solide jusqu'au 9-10^e jour (fig 2). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus

nus pour *G candidum*, en croissance radiale par Fiddy et Trinci (1975) et Guéguen et Jacquet (1982). Sur un tel milieu, *G candidum* croît plus rapidement que *P camem-*

berti, et produit une biomasse finale plus abondante. La phase d'autolyse qui suit est plus rapide pour *G candidum* (fig 2) ; mais au 14^e jour, les diminutions de biomasse

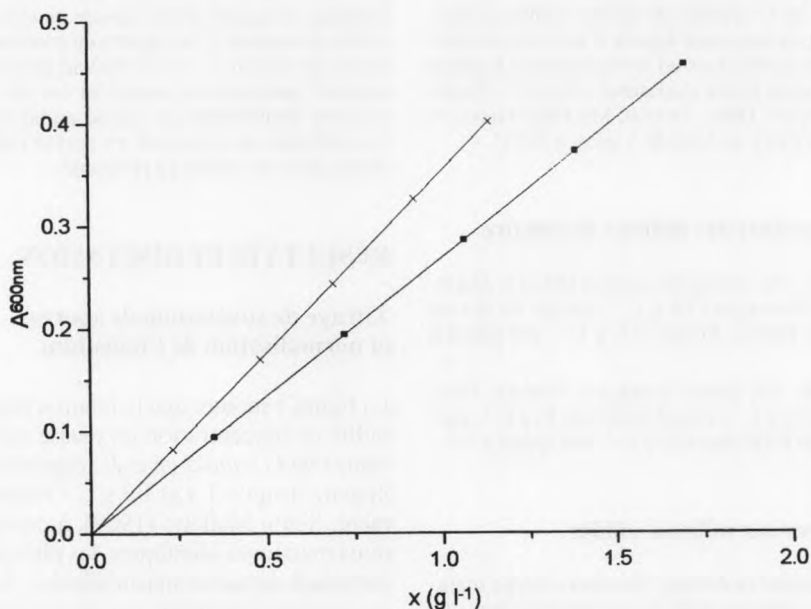


Fig 1. Étalonnage de suspensions de spores : turbidité en fonction de la masse cellulaire sèche de *G candidum* (x) et *P camemberti* (■).

Standardization of spore suspensions : turbidity vs cellular dry weight for *G candidum* (x) and *P camemberti* (■).

Tableau I. Données utilisées pour la normalisation des suspensions de spores de *G candidum* et *P camemberti*.

Data for normalizing spores suspensions of *G candidum* and *P camemberti*.

	Arthrospores de <i>G candidum</i> Geo 17	Conidiospores de <i>P camemberti</i> LV2
Longueur (µm)	11-19	3 - 4
Diamètre (µm)	5-7	2 - 4
Turbidité (A ⁶⁰⁰)	0,381 ± 0,003	0,456 ± 0,003
x (g matière sèche/L)	1,08 ± 0,06	1,70 ± 0,06
A ⁶⁰⁰ /x	0,35 ± 0,02	0,27 ± 0,01
N (spores/mL)	(3,8 ± 0,7) 10 ⁶	(5,5 ± 0,6) 10 ⁶
N/A ⁶⁰⁰	(1,0 ± 0,2) 10 ⁷	(1,2 ± 0,2) 10 ⁷
Taux de viabilité (%)	0,50	12

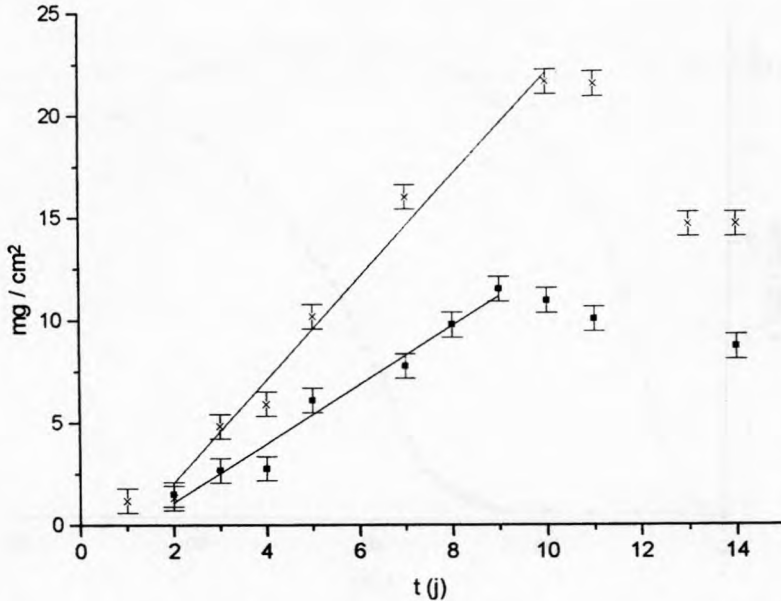


Fig 2. Cinétiques de croissance en culture solide de *G candidum* (x) et *P camemberti* (■).
Growth kinetics on solid cultures for *G candidum* (x) and *P camemberti* (■).

Tableau II. Comparaison des vitesses de croissance en milieux liquides et solides pour *G candidum* et *P camemberti*.

Comparison of the growth rates on liquid and solid media for *G candidum* and *P camemberti*.

	<i>G candidum</i>	<i>P camemberti</i>	Gc/Pc
Domaine de croissance linéaire en milieu liquide (h)	7-14	34-46	
Vitesse de croissance linéaire en milieu liquide (mg cm ⁻³ h ⁻¹)	0,34	0,18	1,89
Domaine de croissance linéaire sur solide (h)	48-240	48-216	
Vitesse de croissance linéaire sur milieu solide (mg cm ⁻² h ⁻¹)	0,105	0,060	1,75
v lin solide / v lin liquide	0,31	0,29	
domaine de croissance exponentielle en milieu liquide (h)	1,5-7	25-34	
μ _{max} en milieu liquide (h ⁻¹)	0,39	0,21	1,86

observées pour les deux espèces par rapport au maximum sont voisines (28 % pour *G candidum* et 24 % pour *P camemberti*).

Le rapport des vitesses linéaires de croissance de *G candidum* et *P camemberti* est de 1,75 (tableau II). Pour une culture sur milieu

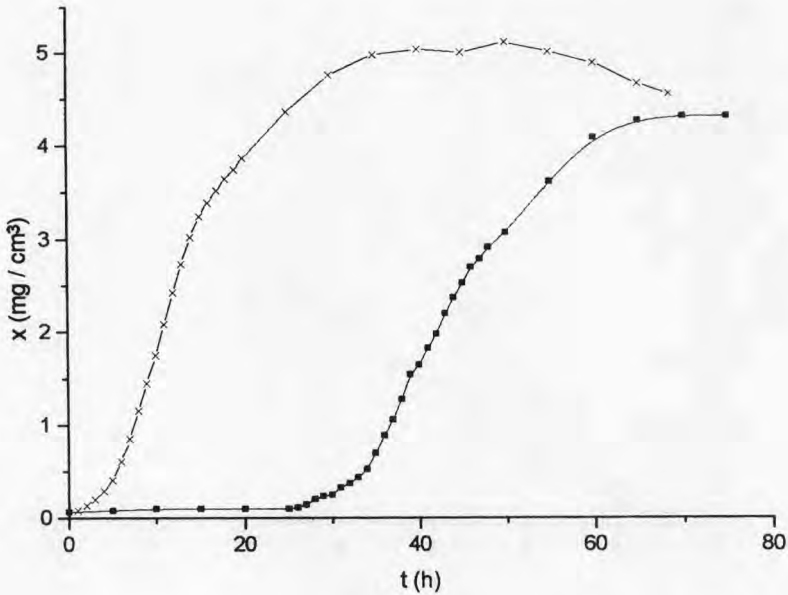


Fig 3. Cinétiques de croissance en culture liquide de *G candidum* (x), *P camemberti* (■).
Growth kinetics in submerged cultures for *G candidum* (x) and *P camemberti* (■).

solide, une phase linéaire de croissance (cinétique d'ordre 0) indique une limitation par diffusion ou dissolution puis diffusion d'un nutriment essentiel, comme la source de carbone et d'énergie, la source d'azote, ou l'oxygène (Bailey et Ollis, 1977). Un moyen simple d'identifier l'oxygène comme facteur limitant est de comparer les cultures sur milieux solides et liquides de même composition.

Cultures en milieux liquides

La figure 3 montre qu'en milieu liquide, la croissance de *P camemberti* commence 24 heures après l'ensemencement, tandis que celle de *G candidum* est pratiquement immédiate.

On observe ensuite, pour chaque moisissure, une phase de croissance exponen-

tielle suivie d'une phase linéaire (tableau II) : pour une culture en phase liquide bien agitée, un tel comportement ne peut s'expliquer que par une limitation de la dissolution d'oxygène (Bailey et Ollis, 1977). Comme le montre le tableau II, le rapport des vitesses linéaires de croissance de *G candidum* et *P camemberti* est de 1,89 : comme les conditions d'aération étaient exactement identiques pour les deux moisissures, ce rapport doit donc être égal à celui de leurs rendements de biomasse en présence d'oxygène. Si cette hypothèse est exacte, le rapport des vitesses de croissance linéaire sur milieu solide doit être identique puisque les conditions d'aération dans les deux boîtes de Pétri étaient les mêmes pour les deux moisissures. Le tableau II montre que c'est bien le cas, puisque les rapports des vitesses de croissance en milieux solide et liquide sont égaux aux erreurs d'expérience près.

La phase linéaire de croissance en milieu liquide est suivie d'un ralentissement progressif, puis d'une phase de maintien pour les deux espèces, et se termine pour *G candidum* (fig 3) par un net déclin. Cette observation n'a pu être réalisée pour *P camemberti*, en raison de sa longue phase de latence ; mais les résultats obtenus en culture solide (fig 1) montrent bien que *P camemberti* s'autolyse lui aussi.

CONCLUSION

Pour des cultures pures de *G candidum* aussi bien que de *P camemberti* réalisées par ensementement uniforme de la surface de milieux-modèles gélifiés, la croissance peut être mesurée par la masse cellulaire sèche correspondant à l'unité de surface de gel : en effet, dans les conditions expérimentales utilisées, la pellicule superficielle de biomasse peut être détachée facilement et quantitativement du cylindre de gel prélevé aseptiquement par carottage.

Sur des géloses au lactate et à l'extrait de levure, on a ainsi montré que la concentration en biomasse totale par unité de surface varie linéairement en fonction du temps, entre le 2^e et le 9-10^e jour de culture pour les deux moisissures.

Sur le plan biotechnologique, cette nouvelle méthode de suivi de la croissance superficielle de moisissures semble plus significative que la méthode traditionnelle (croissance radiale) : en effet, la mesure de la biomasse totale permet de corrélérer la croissance avec la consommation des substrats, par l'intermédiaire des rendements biomasse/substrat. Pour réaliser la même démarche à partir de la vitesse de croissance radiale (cm jour^{-1}), il faut faire des hypothèses sur la variation en fonction du temps de l'épaisseur de la couche cellulaire.

Un turbidimètre spécialement adapté au problème de la croissance des champignons filamenteux en milieux liquides clairs a été

conçu et réalisé au laboratoire. Cet appareil a permis, grâce à un calibrage préalable par rapport à la concentration en masse cellulaire sèche, de suivre en continu la croissance de *G candidum* et surtout de *P camemberti*.

Pour l'une et l'autre des deux moisissures, on observe aussi en culture submergée peu aérée une phase linéaire de croissance, qui ne peut être due qu'à une limitation de la fourniture en oxygène. Le rapport des vitesses linéaires de croissance est égal, aux erreurs d'expérience près, à celui mesuré sur les milieux solides : ce résultat montre que, sur milieu gélifié, la croissance est aussi limitée par l'aération, et non pas par la diffusion depuis le cœur du gel d'un autre substrat essentiel.

Dans l'intervalle d'observation des cultures solides (15 jours), on note pour les deux moisissures une autolyse nette ; il y a donc libération en surface de la culture d'enzymes intracellulaires et de facteurs de croissance utilisables par les flores ultérieures d'affinage (microcoques et bactéries corynéformes) : l'autolyse des deux moisissures devrait donc avoir un impact important sur l'affinage des fromages à pâte molle et à croûte fleurie. Les facteurs qui déclenchent l'autolyse sont donc des éléments importants à élucider pour mieux connaître les mécanismes de l'affinage.

RÉFÉRENCES

- Bailey JE, Ollis OF (1977) *Biochemical engineering fundamentals*. Mc Graw-Hill, New York
- Bockelmann W, Portius S, Heller KJ, Neve H (1996) Scanning electron microscopy of sporulating *Penicillium camemberti* in submerged culture. *Milchwissenschaft* 51, 306-310
- Fiddy C, Trinci APJ (1975) Kinetics and morphology of glucose-limited cultures of moulds grown in a chemostat and on solid media. *Arch Microbiol* 103, 191-197
- Guéguen M, Jacquet J (1982) Études sur les caractères culturaux et la morphologie de *Geotrichum candidum* Link. *Lait* 62, 625-644

- Jarvis B, Seiler DAL, Ould AJL, Williams AP (1983) Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. *J Appl Bacteriol* 55, 325-336
- Lenoir J (1984) The surface flora and its role in the ripening of cheese. *IDF Bulletin* 171, 3-20
- Mallete MF (1969) Evaluation of growth by physical and chemical means. In : *Methods in microbiology*, 1 (JR Norris, DW Ribbons, eds). Academic Press, London, 521-566
- Molimard P, Vassal L, Bouvier I, Spinnler HE (1995) Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type camembert. *Lait* 75, 3-16
- Mourgues R, Bergère JL, Vassal L (1983) Possibilités d'améliorer les qualités organoleptiques des fromages de camembert grâce à l'utilisation de *Geotrichum candidum*. *Tech Lait* 978, 11-15
- Robinson PM, Smith JM (1976) Morphogenesis and growth kinetics of *Geotrichum candidum* in continuous culture. *Trans Br Mycol Soc* 66, 413-420
- Robinson PM, Griffith PJ (1977) Effect of restricted aeration on chemotropism, morphogenesis and polarity of lateral branch induction in *Geotrichum candidum* link ex pers. *Trans Br Mycol Soc* 68, 311-314
- Trinci APJ, Collinge AJ (1974) Spore formation in nitrogen and carbon starved cultures of *Geotrichum candidum* and *Mucor racemosus*. *Trans Br Mycol Soc* 62, 351-358