



Lyofast CNBAP inhibe la charge de *Pseudomonas* spp. sans répercussions sur les caractéristiques sensorielles du produit fini.

#### Abstrait

Parmi les contaminants souvent présents dans le fromage mozzarella, *Pseudomonas* spp. représentent le problème le plus fréquent, entraînant une réduction de la durée de conservation, une éventuelle décoloration du produit et des pertes économiques conséquentes pour les entreprises laitières. Une stratégie intelligente pour contenir *Pseudomonas* spp. la contamination lors de la production de mozzarella est l'ajout de cultures bactériennes testées pour pouvoir contenir les *Pseudomonas* spp. propagation : un mélange commercial de *Carnobacterium* spp. a été testé contre un *Pseudomonas* spp. cocktail (constitué de souches principalement isolées de mozzarella) directement dans la saumure de mozzarella et a permis de réduire la quantité finale de *Pseudomonas* spp. compter sans altérer le panneau sensoriel.

#### Introduction

La détérioration microbienne des fromages frais est une grande préoccupation pour l'industrie laitière car les changements dans les caractéristiques sensorielles des produits réduisent la qualité, nuisent à la réputation des fabricants de fromage et peuvent entraîner de graves pertes économiques pour les entreprises laitières (del Olmo, et al., 2018).

Le fromage mozzarella est le membre le plus populaire de la famille des pâtes filées : ce groupe diversifié est soumis à un processus d'étirage unique, qui a lieu dans de l'eau chaude à 65-85 °C. Ensuite, au cours de la production, des boules de fromage sont formées et laissées refroidir dans un deuxième bain-marie à 14-15 °C avant d'être conditionnées dans une saumure contenant 0,45 % de sel.

La teneur élevée en humidité de 50 à 60 %, le pH d'environ 5,5 (légère acidité) et la faible teneur en sel, rendre le fromage Mozzarella sensible à la croissance de micro-organismes pathogènes et d'altération (De Candia et al., 2007).

Les contaminants courants du fromage mozzarella comprennent *Pseudomonas* spp. ce qui représente le principal obstacle à la prolongation de la durée de conservation de ce type de produit.

*Pseudomonas* spp. sont des bactéries à Gram négatif omniprésentes et psychrotolérantes, fréquemment isolées du lait cru réfrigéré. Bien qu'ils soient inactivés par la pasteurisation, *Pseudomonas* spp. peuvent pénétrer dans les produits transformés par contamination post-pasteurisation provenant des usines de transformation laitière via les matières premières, le sol et l'eau. *Pseudomonas* spp. peut survivre et se développer dans différents environnements, il peut coloniser les surfaces des ustensiles et des équipements utilisés dans les chaînes de production laitière, formant des biofilms sur les surfaces des installations de transformation laitière qui aident ces micro-organismes à persister longtemps dans l'environnement.

Les défauts constatés sur les fromages mozzarella dus à leur croissance sont provoqués par la libération d'enzymes ou de pigments, avec un impact négatif sur la structure, la texture et les propriétés sensorielles des produits.

Afin de réduire le nombre initial de microbes, l'application stricte de bonnes pratiques d'hygiène et de bonnes pratiques de fabrication est essentielle, mais des stratégies supplémentaires sont souvent nécessaires pour contrôler la croissance de *Pseudomonas* spp.

L'utilisation de cultures ayant un effet protecteur représente une intervention potentielle pour améliorer la sécurité des produits laitiers et contenir la propagation de cultures indésirables. La plupart des souches composant les cultures à effet protecteur appartiennent au groupe des bactéries lactiques (LAB), qui ont une longue histoire d'utilisation sûre comme cultures starter dans les fermentations alimentaires (Holzapfel et al., 1995). Par conséquent, l'ajout de cultures à effet protecteur aux produits fermentés comme le fromage ne nécessite pas un étiquetage supplémentaire correspondant ainsi à la demande des consommateurs pour des aliments « clean label ». En outre, les cultures commerciales ayant un effet protecteur sont souvent sélectionnées pour leurs propriétés souhaitables, notamment



effets limités sur la saveur et l'acidité des aliments (Spanu et al., 2018). Parmi les LAB, le genre *Carnobacterium* spp. a été étudié en profondeur pour sa capacité à produire des bactériocines (Bhugaloo-Vial et al., 1996, 1999).

Les carnobactéries sont des bactéries lactiques (LAB) Gram positives en forme de bâtonnet isolées de différentes niches écologiques. Grâce à sa capacité à produire des bactériocines, le genre *Carnobacterium* a été utilisé comme culture protectrice pour assurer durabilité et sécurité à divers types d'aliments (fromage, poisson et produits carnés). Parmi les espèces incluses dans le genre *Carnobacterium*, deux, *C. divergens* et *C. maltaromaticum*, sont fréquemment isolées du milieu naturel et des produits laitiers.

L'objectif de ce travail était d'étudier la capacité de Lyofast CNBAP (Sacco, Cadorago Italie), un mélange commercial lyophilisé de *C. divergens* et de *C. maltaromaticum*, à contrôler la propagation de *Pseudomonas* spp. dans le fromage mozzarella, artificiellement contaminé par ce micro-organisme d'altération.

## matériel et méthodes

### *Pseudomonas* souches et conditions de croissance

Les souches de *Pseudomonas* utilisées dans ce travail sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des *Pseudomonas* spp. souches utilisées pour constituer le « cocktail *Pseudomonas* »

Espèces	Isolé de
<i>Pseudomonas putida</i>	Fromage mozzarella
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Fromage mozzarella
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souche de collecte (fournie par la norme LGC)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fromage mozzarella
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fromage mozzarella
<i>Pseudomonas jessenii</i>	Fromage mozzarella
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Fromage mozzarella
<i>Pseudomonas lutéola</i>	Eau

La plupart des souches ont été isolées directement du fromage mozzarella, une souche de l'eau et une souche a été fournie par la norme LGC. L'espèce de la souche a été confirmée par l'ARNr 16S séquençage.

Les souches ont été repiquées deux fois dans un bouillon BHI (Thermo Scientific, Oxoid, UK) et incubées à 30 ° C pendant la nuit. Ces souches ont été ajoutées en volume égal, créant un pool appelé *Pseudomonas* cocktail, qui a été utilisé pour contaminer la saumure de Mozzarella.

### Contamination de la mozzarella et conception expérimentale

L'étude a été menée sur des échantillons de mozzarella fournis par une fromagerie industrielle locale.

La saumure de Mozzarella a été inoculée avec  $1 \times 10^3$  UFC/ml de *Pseudomonas* spp. piscine décrite précédemment (Cocktail *Pseudomonas*).

Après l'inoculum de *Pseudomonas*, les saumures ont également été inoculées avec la culture à effet protecteur Lyofast CNBAP (Sacco, Cadorago, Italie). La poudre lyophilisée a été diluée dans du tampon phosphate afin d'inoculer  $1 \times 10^6$  UFC/ml dans le produit. Un contrôle négatif (uniquement contaminé par *Pseudomonas* spp.) a également été mis en place. Après inoculation, tous les échantillons ont été incubés à 4°C pendant 20 jours.



Des échantillons en triple de chaque mozzarella ont été analysés le jour de l'inoculation (T0), et après 11 et 20 jours de stockage à 4°C. À chaque instant, les échantillons ont été analysés pour la détermination de *Pseudomonas* spp. compter.

Les échantillons de mozzarella ont d'abord été homogénéisés dans une solution tampon phosphate ; les échantillons homogénéisés ont été dilués en série dans un tampon phosphate stérile, puis 100 µl ont été étalés en double sur de la gélose *Pseudomonas* Cetrimide (Thermo Scientific, Oxoid, UK) et incubés à 30 ° C pendant 48 h.

#### Évaluation sensorielle

Afin d'exclure l'impact négatif de l'ajout de Lyofast CNBAP dans la mozzarella, une évaluation sensorielle a été réalisée par un panel formé.

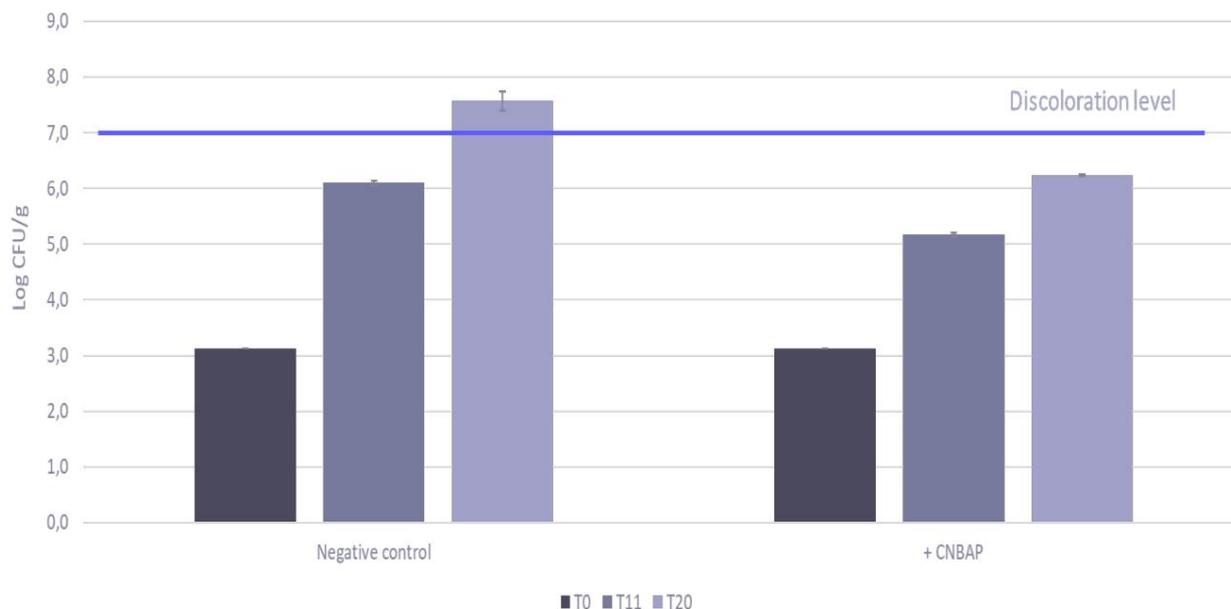
#### Résultats et discussions

Pendant toute la durée de conservation, le nombre de *Pseudomonas* a été surveillé.

Le cocktail *Pseudomonas* a atteint un niveau pouvant atteindre 7 log CFU/g après 20 jours de stockage réfrigéré (Figure 1).

L'utilisation de la culture à effet protecteur Lyofast CNBAP s'est avérée efficace pour réduire *Pseudomonas* concentration en spp, respectivement de 0,93 log CFU/g et 1,3 log CFU/g après 11 et 20 jours de stockage (Figure 1), maintenant ainsi le niveau de contamination sous le « niveau de décoloration » de 7 Log CFU/g (Carminati et al 2019).

Tableau 2 : Evolution de la croissance du cocktail *Pseudomonas* (log<sub>10</sub> UFC/g ; x ± SD) dans la mozzarella pendant le stockage réfrigéré

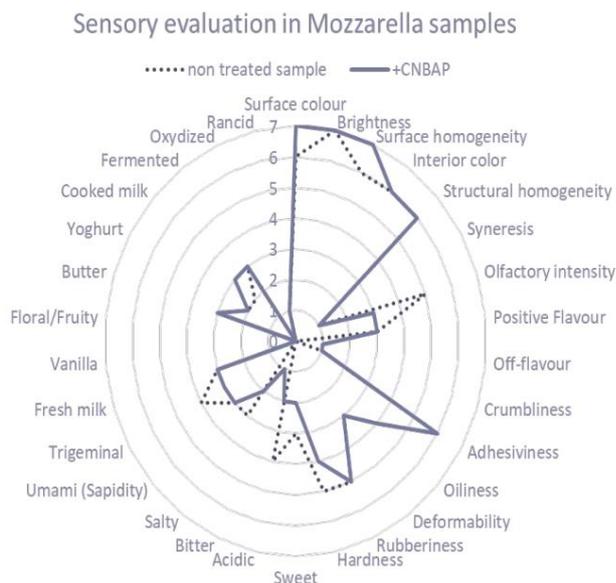


La mozzarella est particulièrement sensible à la contamination secondaire provenant de l'environnement de transformation et représente un excellent substrat pour la croissance de micro-organismes psychotropes pathogènes et d'altération, car elle n'est pas trop acide et la saumure a une concentration de NaCl contenue et il est donc nécessaire de trouver une méthode pour la protéger. ce substrat.

Une stratégie possible consiste à utiliser des cultures microbiologiques visant à contrôler la multiplication des contaminants. L'étude, menée sur de la Mozzarella contaminée « artificiellement », a indiqué *Carnobacterium* spp comme une culture possible ayant un effet protecteur à utiliser pour contenir la croissance de *Pseudomonas* spp.

L'évaluation sensorielle de la Mozzarella non contaminée et de celle traitée par Lyofast CNBAP (+ CNBAP) a confirmé que la culture à effet protecteur ne modifiait pas la voie aromatique et la texture des échantillons traités (Figure 2).

Figure 2 : Évaluation sensorielle des échantillons de Mozzarella.



#### Conclusions :

Lyofast CNBAP peut survivre et se développer dans des conditions de pH, de concentration en NaCl et de température similaires aux micro-organismes psychotropes d'altération : ainsi, l'ajout de CNBAP à la saumure de Mozzarella pendant la durée de conservation peut limiter la croissance de *Pseudomonas* spp., améliorant ainsi la durabilité des aliments réfrigérés . .

#### Les références :

1. del Olmo, A., Calzada, J. et Nuñez, M. (2018). La décoloration bleue des fromages frais : Un défaut mondial associé à une contamination spécifique par *Pseudomonas fluorescens*. *Contrôle des aliments*, 86, 359-366.
2. De Candia, S., De Angelis, M., Dunlea, E., Minervini, F., McSweeney, PLH, Faccia, M. et Gobbetti, M. (2007). Identification moléculaire et typage des ferments naturels de lactosérum et propriétés microbiologiques et de composition des fromages Mozzarella traditionnels apparentés. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 119(3), 182-191.
3. Holzapfel, WH, Geisen, R. et Schillinger, U. (1995). Conservation biologique des aliments en référence à des cultures protectrices, des bactériocines et des enzymes de qualité alimentaire. *Revue internationale de microbiologie alimentaire*, 24(3), 343-362.



4. Spanu, C., Piras, F., Mocchi, AM, Nieddu, G., De Santis, EPL et Scarano, C. (2018). Utilisation de la culture protectrice de *Carnobacterium* spp dans le fromage Ricotta fresca emballé sous MAP pour contrôler *Pseudomonas* spp. *Microbiologie alimentaire*, 74, 50-56.
5. Carminati, D., Bonvini, B., Rossetti, L., Zago, M., Tidona, F. et Giraffa, G. (2019). Enquête sur la présence de souches de *Pseudomonas* productrices de pigment bleu le long d'une chaîne de production de fromage mozzarella frais. *Contrôle des aliments*, 100, 321-328.
6. Bhugaloo-Vial, P., Douliez, JP, Mollé, D., Dousset, X., Boyaval, P. et Marion, D. (1999). Délimitation des chaînes latérales d'acides aminés clés et des domaines peptidiques pour les propriétés antimicrobiennes de la divercine V41, une bactériocine de type pédiocine sécrétée par *Carnobacterium divergens* V41. *Microbiologie appliquée et environnementale*, 65(7), 2895-2900.
7. Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P. et Marion, D. (1996). Purification et séquences d'acides aminés des pisciocines V1a et V1b, deux bactériocines de classe IIa sécrétées par *Carnobacterium piscicola* V1 qui présentent des niveaux significativement différents d'activité inhibitrice spécifique. *Microbiologie appliquée et environnementale*, 62(12), 4410-4416.