

Garantir la qualité des fromages au lait cru

effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*

THÉMATIQUE DE RECHERCHE :

Qualité microbiologique
des produits
et des procédés

La production de fromages traditionnels au lait cru, en particulier les fromages d'appellation d'origine contrôlée (AOC) tient une place importante dans l'économie laitière française. Les travaux de l'Unité de Recherches fromagères du centre Inra de Clermont-Ferrand, Theix, Lyon visent à maîtriser la qualité des fromages au lait cru en se donnant comme priorité leur sécurité sanitaire sans altérer la diversité et la richesse de leurs qualités sensorielles.

CONTEXTE

Les fromages au lait cru doivent répondre aux exigences des normes sanitaires de la réglementation européenne vis-à-vis des germes pathogènes et des germes indicateurs d'hygiène. Il en découle que le risque sanitaire associé à leur consommation est très faible comme en témoigne le nombre peu élevé de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et de listériose au regard d'une production annuelle qui dépasse 180 000 tonnes.

Cette maîtrise procède de contrôles rigoureux mis en œuvre tout au long de la chaîne de production et repose également sur les fromages au lait cru qui assurent eux-mêmes leur défense. Les barrières biologiques, liées à la biodiversité microbienne qui les caractérise et, dans une moindre mesure les barrières environnementales (température, oxygène..) seraient particulièrement actives dans ce type de production.

L'objectif de nos recherches est de déterminer la nature des barrières biologiques, clef de voûte de la biopréservation des fromages au lait cru depuis des millénaires.

DÉMARCHE DE RECHERCHE

Pour comprendre les fonctions inhibitrices des communautés microbiennes (écosystèmes) des fromages au lait cru, nous avons adopté une démarche d'écologie microbienne :

1. en sélectionnant, à partir de fromages au lait cru bons et conformes aux normes sanitaires, des écosystèmes qui ont donc fait leur preuve dans les conditions de production fermière,
2. en confirmant les capacités inhibitrices de ces écosystèmes dans les conditions de production,
3. en déterminant l'évolution de ces communautés microbiennes tout au long du procédé par culture des microorganismes ou par des méthodes moléculaires sans culture,
4. en fabriquant des fromages expérimentaux avec des communautés microbiennes plus ou moins complexes contenant *Listeria monocytogenes* et en analysant l'évolution des populations, la production de métabolites et l'effet anti-microbien au cours du temps. ➔

↳ Dans la cadre d'un programme de recherche ANR¹ et d'un programme européen Truefood², cette démarche appliquée à des productions fermières de Saint-Nectaire a révélé la diversité microbienne des laits crus capables d'inhiber *L. monocytogenes* dans des fromages de type pâte pressée non cuite. La communauté microbienne d'un seul lait cru inhibiteur est composée de 45 espèces microbiennes qui appartiennent à plusieurs groupes (bactéries lactiques, bactéries Gram positif non lactiques, bactéries Gram négatif, levures). Par omission successive d'un ou plusieurs groupes de cette communauté, nous avons montré que les populations de bactéries lactiques sont les plus impliquées dans l'inhibition de *L. monocytogenes* lors de l'affinage des fromages et qu'elles agiraient en synergie avec des populations de bactéries non lactiques. L'effet anti-*Listeria* serait dû à la production de métabolites (acides organiques, esters) plutôt qu'à celle de bactériocines.

Nous sommes arrivés à des conclusions similaires pour les communautés microbiennes isolées de la croûte du Saint Nectaire. Lors de leur conservation à l'état congelé, ces communautés conservent leur pouvoir inhibiteur pendant plusieurs mois. Par contre, leur simplification ne permet pas de maintenir l'inhibition.

Ces études ont également révélé la limite des approches moléculaires directes sans culture pour suivre la dynamique des populations sous-dominantes dans un écosystème. La combinaison de cultures microbiennes et de l'identification moléculaire d'isolats s'avère la méthode la plus performante malgré son manque de rapidité. Ces résultats soulignent les défis que nous devons relever 1) reconstituer des communautés complexes tout en conservant leurs propriétés antagonistes et 2) mettre au point des méthodes rapides de suivi dans le temps de la composition de communautés microbiennes contenant plus de 10 espèces.

Aujourd'hui, préserver la diversité microbienne, clef de voûte de la richesse et de la diversité sensorielle des fromages au lait cru tout en évitant le développement des pathogènes reste un défi pour les producteurs de fromages au lait cru. Nos travaux montrent que la diversité des communautés microbiennes est un atout pour maîtriser *L. monocytogenes* dans ces fromages. Notre objectif est maintenant de révéler les secrets de fonctionnement de l'écosystème fromage au lait cru tout en levant des verrous méthodologiques d'investigation afin de mieux appréhender leur complexité.

1. Les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber le développement de *Listeria monocytogenes* dans les filières fromagères traditionnelles ? Le cas du fromage AOC Saint-Nectaire Appel AQS 2001
2. Truefood 2006 -2009 Improving quality and fostering innovation of European traditional food production systems

Ensuring the quality of raw milk cheeses: barrier effect of raw milk microbial ecosystems on *Listeria monocytogenes*

RESEARCH AREA:

Microbiological quality
 of products and processes

The production of traditional raw milk cheeses, especially those with Controlled Designation of Origin (AOC) labels, play an important part in the French dairy economy. Work at the Cheese Research Laboratory of the INRA Clermont-Ferrand – Theix – Lyon Research Centre is geared at controlling the quality of raw milk cheeses, with food safety as the main priority while maintaining the diversity and richness of their sensorial qualities.

BACKGROUND

Raw milk cheeses must meet health standards as laid out in EU regulations for pathogens and biological safety indicators. The health risk tied to their consumption is very low, as evidenced by the low number of collective food toxoinfections and listeriosis in relation to an annual production exceeding 180,000 tonnes.

This control is a result of rigorous inspections performed throughout the production chain, and is also dependent on raw milk cheeses that protect themselves. Biological barriers, linked to the microbial biodiversity that characterise them, and – to a lesser extent – environmental barriers (temperature, oxygen, etc.) are thought to be especially active in this type of production.

Our research objective is to determine the nature of biological barriers, which have formed the keystone of bioconservation for raw milk cheese for thousands of years.

RESEARCH APPROACH

For a better understanding of the inhibitory functions of microbial communities (ecosystems) of raw milk cheeses, we have adopted a microbial ecology approach:

1. by selecting ecosystems that have proved themselves in farm production conditions, from good raw milk cheeses that meet health standards,
2. by verifying the inhibitory capacities of these ecosystems in production conditions,
3. by determining the evolution of these microbial ecosystems throughout the process using microbial cultures or culture-free molecular methods,
4. by producing experimental cheeses with more or less complex microbial communities containing *Listeria monocytogenes* and analysing population changes, metabolite production and anti-microbial effect over time. ➔

➤ As part of an ANR¹ research programme and the Truefood² European programme, this approach, as applied to farm producers of Saint-Nectaire, revealed the microbial diversity of raw milks capable of inhibiting *L. monocytogenes* in uncooked pressed cheeses. The microbial ecosystem of a single type of raw milk with inhibitory properties is composed of 45 microbial species from several groups (lactic acid bacteria, Gram-positive non-lactic acid bacteria, Gram-negative bacteria, yeasts). Through the successive omission of one or several groups in this community, we showed that lactic acid bacteria populations are most involved in the inhibition of *L. monocytogenes* during the cheese ripening stage, and that they act in synergy with non-lactic acid bacteria populations. The anti-Listeria effects appear to result from the production of metabolites (organic acids, esters) rather than bacteriocins.

We reached similar conclusions for microbial communities isolated from Saint Nectaire rind. Stored frozen, these communities keep their inhibitory properties for several months. However, simplification does not maintain inhibition.

These studies have also shown the limits of direct, culture-free molecular approaches in monitoring the dynamics of subdominant populations in an ecosystem. The combination of microbial cultures and the molecular identification of isolates proved to be the most effective method, despite its slowness. These results highlight the challenges that must be met: 1) recreating complex communities while maintaining their antagonistic properties and 2) developing rapid methods for monitoring the composition of microbial communities containing more than 10 species.

Today, maintaining the microbial diversity that holds the key to the sensorial diversity and richness of raw milk cheeses while preventing the development of pathogens remains a challenge for producers. Our work shows that the diversity of microbial communities is an asset in controlling *L. monocytogenes* in these cheeses. Our current goal is to discover the secrets behind the function of raw milk cheese ecosystems while unlocking investigation methods in order to gain a better understanding of their complex nature.

1. Can microbial ecosystems inhibit the development of *Listeria monocytogenes* in traditional cheese-making? The case of AOC Saint-Nectaire cheese. AQS 2001
2. Truefood 2006 -2009 Improving quality and fostering innovation of European traditional food production systems