LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- J. PIEN. — Production biologique des substances concourant à la formation de l'arome du beurre 337
- M. A. CUÉNOT. — La farine lactée 355
- W. KOPACZEWSKI. — Etude physico-chimique du lait. Gélification (*suite*) . . . 365

Revue :

- G. GÉNIN. — L'industrie laitière dans le monde. . . . 400

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres. 408

- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 422
- 3^o Brevets 439

Bulletin bibliographique :

- Journaux, Revues, Sociétés savantes 441

Documents et informations :

- La situation laitière en Suisse 443
- L'effort de guerre de l'Agriculture britannique . . . 446
- Fonctionnement des laiteries suédoises pour l'année comptable 1945 447
- Record de production laitière 448
- Le beurre de zébu 448

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

PRODUCTION BIOLOGIQUE DES SUBSTANCES CONCOURANT A LA FORMATION DE L'AROME DU BEURRE (2)

par

JEAN PIEN

Ingénieur chimiste, Docteur ès Sciences
Directeur des Laboratoires de la S.A.F.R.

Nature de l'arome du beurre. Le diacétyle

Il est difficile de définir avec précision ce qu'on entend par « arome du beurre ». L'ensemble des sensations (saveur et odeur) qui se superposent lors de la dégustation d'un beurre de qualité correspond à la présence dans cet aliment d'un certain nombre de substances de nature et d'origines extrêmement différentes parmi lesquelles il semble que l'on puisse noter : certains acides gras libres, certains glycérides de composition particulière, des esters d'acide gras (notamment des esters butyriques utilisés d'ailleurs

(1) Reproduction interdite sans indication de source,

(2) Conférence n° 1971 faite le 7 novembre 1947 au Centre de Perfectionnement technique de la Maison de la Chimie, Paris.

dans la préparation de certains arômes synthétiques), des composés aldéhydiques ou cétoniques, etc.

Certaines de ces substances trouvent leur origine dans l'alimentation des vaches laitières. C'est ainsi que les « beurres d'herbe » ont un arôme plus prononcé que les beurres d'hiver. Selon ORLA-JENSEN [1] l'arôme fin du beurre d'Isigny doit être attribué pour une large part aux excellents pâturages normands. D'autres proviennent de l'action de certains *microorganismes* s'attaquant soit aux substances précédentes complexes issues de l'alimentation, soit aux éléments normaux élaborés dans le lait. Le mécanisme de la formation de l'arôme, comme l'arôme lui-même, est donc complexe. Et il n'est pas encore permis, dans l'état actuel de nos connaissances, de délimiter le rôle exact de ces divers corps dans la formation de l'arôme, ni même d'établir la liste complète et exacte des substances dites « aromatiques ».

Quoi qu'il en soit, et en dépit des incertitudes qui règnent encore dans ce domaine, deux points d'une importance capitale sont d'ores et déjà acquis et ne soulèvent plus de discussion :

1. De toutes les substances aromatiques, la plus importante et la plus caractéristique est un composé chimique défini, appartenant à la classe des α -diones (ou α -dicétones) que l'on désigne sous le nom de butane-dione 2-3 ou plus communément : *diacétyle* ($\text{CH}_3\text{CO.CO.CH}_3$).

2. Cette substance, ainsi que les corps voisins qui l'accompagnent dans les beurres aromatiques, est certainement d'origine *fermentaire*.

Sur le premier point rappelons brièvement que plusieurs auteurs (SCHMALFUS et BARTHEMEYER en 1928, Van NIEL, KLUYVER et DERX en 1929) [2, 3] ont clairement établi que les beurres aromatiques contiennent presque toujours du diacétyle (0 mgr. 5 à 1 mgr. 5 par kilogramme), qu'un apport de diacétyle à des beurres sans arôme leur communique les caractères organoleptiques des beurres aromatiques — ou des caractères très voisins — et que, dans la majorité des cas, l'intensité de l'arôme varie comme la teneur en diacétyle. Il y a, certes, des exceptions à cette dernière règle ; on note même des observations qui contredisent cette affirmation — ce qui tend à confirmer que le diacétyle n'est pas l'unique constituant de l'arôme. Il n'en reste pas moins que, dans l'ensemble et d'une manière très générale, le *diacétyle doit être tenu pour le constituant essentiel de l'arôme du beurre*.

Sur le second point, la preuve est faite que, d'une part le lait et la crème fraîche ne contiennent jamais de diacétyle, que les beurres préparés à partir de crème douce (c'est-à-dire n'ayant subi aucune

fermentation) sont dénués d'arome et ne renferment pas de diacétyle ; d'autre part que les beurres aromatiques proviennent toujours de crème ayant subi la maturation — ce qui ne signifie d'ailleurs pas que les crèmes « mûries » conduisent toujours nécessairement à des beurres aromatiques.

La maturation, c'est-à-dire l'acidification de la crème sous l'influence de la fermentation lactique, apparaît donc comme une conditions nécessaire — mais non toujours suffisante — de la formation de l'arome c'est-à-dire, dans l'ensemble, de la formation du diacétyle.

Origine du diacétyle. L'acétylméthylcarbinol

Ainsi donc le diacétyl, constituant essentiel de l'arôme, aurait une origine fermentaire.

A vrai dire, ce caractère est contesté par de nombreux auteurs qui voient dans le diacétyle le produit d'oxydation d'une autre substance régulièrement formée par fermentation, toujours très abondante dans les fermentations aromatiques (beaucoup plus que le diacétyle puisque le rapport de l'un à l'autre est toujours de l'ordre de 10 à 20 pour 1) et qui présente la composition d'un alcool secondaire cétonique.

Cette substance est appelée acétylméthylcarbinol, communément désignée sous le nom d'acétoïne, de formule $\text{CH}^3.\text{CHOH}.\text{CO}.\text{CH}^3$ (sans saveur et sans odeur à l'état pur).

On conçoit que ce céto-alcool puisse être considéré comme le produit de réduction du diacétyle, donc que ce dernier puisse se former par oxydation de l'acétoïne.

En fait, il est exact que l'acétoïne s'oxyde aisément au contact de l'oxygène atmosphérique pour donner du diacétyl suivant la réaction :

Une crème douce à laquelle on incorpore de l'acétoïne n'est pas aromatique. Mais elle le devient rapidement si on l'aère convenablement. On constate alors que l'acétoïne a diminué et qu'il est apparu du diacétyl en quantité correspondante. De même le barattage de cette crème douce additionnée d'acétoïne (donc sans arôme) conduit à un beurre aromatique parce que le barattage réalise des conditions d'oxydation favorables à la transformation acétoïne $\rightarrow$ diacétyl.

Ces faits semblent donner raison aux auteurs qui prétendent que le diacétyle ne résulte jamais *directement* d'un processus fermentaire mais uniquement de l'oxydation de l'acétoïne. Nous verrons plus loin ce qu'il y a lieu d'en penser.

Quoi qu'il en soit, si cette hypothèse est exacte, et il y a tout lieu de croire qu'elle l'est en grande partie, la formation du diacétyle ne se présenterait que comme un épi-phénomène complétant un cycle biologique antérieur beaucoup plus important qui conduit à la formation de l'acétoïne.

Le problème de la production biologique de l'arome des crèmes et des beurres se ramène donc en définitive à celui de l'*origine fermentaire de l'acétoïne* et c'est là ce qui doit dominer notre étude.

Nous pouvons concevoir et examiner deux aspects de ce problème :

1. *Un aspect bactériologique.* Quels sont les microorganismes qui donnent naissance à l'acétoïne ? Quelles sont leurs propriétés ? Dans quelles conditions donnent-ils naissance à cette substance ?

2. *Un aspect biochimique.* A partir de quelles substances et par quel mécanisme ces microorganismes forment-ils l'acétoïne et — s'il y a lieu — le diacétyle lui-même ?

* * *

PREMIÈRE PARTIE

Bactériologie de la formation de l'arome

Il est intéressant de noter que les acquisitions relatives à la bactériologie des ferments d'arome ont précédé d'une dizaine d'années la connaissance chimique des substances aromatiques. Les premiers travaux importants concernant la bactériologie de l'arome du beurre remontent en effet à une trentaine d'années. Ils sont dus notamment à BOEKHOUT en Hollande (1917), STORCH au Danemark (1919) et HAMMER aux Etats-Unis (1919) [4, 5, 6].

Jusque là, pour réussir la maturation de la crème en vue d'aboutir à un beurre aromatique, on utilisait des cultures d'une bactérie lactique particulière appelée *bactérie de Storch* et à laquelle ORLA-JENSEN [7], après l'avoir étudiée en détail, avait donné le nom de *Str. cremoris*. Il s'agissait d'un ferment lactique véritable se classant à côté de *Str. lactis* et n'en différant que par quelques propriétés secondaires. En fait, cette manière de faire conduisait — d'une manière irrégulière — à la formation de l'arome. Parfois même l'emploi de certaines souches de *Str. lactis* sélectionnées empiriquement conduisait aussi à de bons résultats (1).

I. Découverte des bactéries d'arome

Toutefois, en examinant plus en détail des crèmes aromatiques

(1) Nous verrons plus loin que cette manière de faire était parfaitement fondée et qu'elle pourrait être reprise sur des bases améliorées.

mûries spontanément ou ces levains empiriques dans le cas où ils donnaient un plein arôme, les auteurs cités plus haut y découvrirent et en isolèrent plusieurs espèces de streptocoques particuliers présentant des propriétés différentes de *Str. lactis* et de *Str. cremoris* et auxquelles ils reconnurent, après de nombreuses expériences, la propriété spécifique de produire de l'acétone dans certaines conditions (1).

Les caractères principaux de ces bactéries nouvelles étaient les suivants :

Morphologie identique à celle des streptocoques lactiques vrais (ce qui explique en partie qu'elles soient longtemps passées inaperçues), acidification très faible et très lente du lait (production d'acide lactique pratiquement nulle); en revanche formation d'acides volatils (acide acétique exclusivement), d'anhydride carbonique et d'autres substances volatiles non identifiées à l'époque. On s'aperçut rapidement que ces germes employés seuls ne formaient pas d'arôme mais qu'ils en produisaient quand ils étaient cultivés en commun avec les streptocoques lactiques auxquels on les trouvait associés dans les bons levains empiriques. Enfin, propriété fondamentale, on découvrit que ces bactéries avaient la faculté de détruire rapidement l'acide citrique, ce qui leur valut d'être baptisées par HAMMER : *Str. citrovorus*.

La conclusion de ces premiers travaux fut donc la suivante : les levains reconnus capables de produire la fermentation aromatique des crèmes sont et doivent être constitués par des mélanges de *Str. citrovorus* et *Str. cremoris* (ou même *Str. lactis*).

De nombreuses études ultérieures ont précisé et confirmé cette acquisition et ont fait la lumière sur les avantages et les inconvénients de ces cultures associées. Nous allons rencontrer les principaux de ces résultats en étudiant systématiquement les propriétés de ces bactéries d'arôme.

II. Classification des bactéries d'arôme

Il s'agit d'abord de situer *Str. citrovorus* dans la systématique microbienne.

Dès la découverte des bactéries d'arôme fermentant l'acide citrique (2), on pensa qu'il ne s'agissait pas de ferments lactiques véritables à moins de considérer que l'on avait affaire à des formes affaiblies de *Str. cremoris*, ce qui ne résista pas à l'examen.

(1) Mentionnons aussi que dans les beurres les plus aromatiques (Isigny) préparés avec des crèmes surmaturées spontanément Orla-Jensen découvrit également des levures productrices d'arôme (8).

(2) Nous désignons de la sorte les streptocoques du type *Str. citrovorus* et *paracitrovorus* de Hammer.

En fait les propriétés de ces germes, brièvement rappelées ci-dessus, semblaient bien interdire toute possibilité de les classer parmi les ferments lactiques.

Les ferments lactiques vrais donnent de l'acide lactique (dextrogyre) avec seulement des traces de produits accessoires alors que *Str. citrovorus* ne donne pratiquement pas d'acide lactique et beaucoup de produits accessoires.

Les travaux d'ORLA-JENSEN en 1926 [9] aboutirent à fixer la place définitive de ce germe parmi les bétacoques ainsi définis par cet auteur « ferments lactiques vrais, formant de l'acide lactique lévogyre à côté de produits accessoires : acides volatils, gaz carbonique, etc. »

Les étapes successives de cette étude sont extrêmement intéressantes à rappeler :

1. *Str. Citrovorus* est un ferment lactique véritable.

Cultivé en lait, *Str. citrovorus* ne donne que des quantités insignifiantes d'acide lactique. En même temps on constate un développement très faible des cellules bactériennes. Le lait n'est donc pas le milieu de choix pour la culture de ce germe. ORLA-JENSEN eut l'idée de le cultiver dans des milieux artificiels ou dans du lait additionnés d'autolysat de levure. Il constata alors la formation d'acide lactique dans des proportions aussi élevées que lorsqu'il s'agit de streptocoques lactiques purs. Il n'est donc pas douteux que *Str. citrovorus* est un ferment lactique véritable — pour lequel le lait pur constitue un très mauvais milieu de culture (1).

Remarques :

a) On savait déjà que l'extrait de levure favorise les betabactéries. Ainsi *Bbm. caucasicum* des grains de képhir ne croît pas dans le lait et n'y forme pas d'acide lactique. Il n'acidifie le lait qu'en symbiose avec les levures du képhir ce qui correspond à l'addition d'extrait de levure.

b) L'autolysat de levure favorise aussi un peu *Str. cremoris* mais pas du tout *Str. lactis*.

c) L'action favorisante de l'autolysat de levure semble devoir être rattachée à l'influence des vitamines du groupe B qu'il renferme.

d) Il résulte de ce qui précède que l'on pourrait être tenté d'utiliser l'autolysat de levure dans la préparation des levains. Plusieurs raisons s'opposent à cette manière de faire : d'une part, en souches pures, l'autolysat « amollit » à la longue les germes qu'il favorise au

(1) Certains auteurs écrivirent que l'autolysat de levure avait la propriété de transformer *Str. citrovorus* en *Str. lactis*.

début et leur fait perdre peu à peu la faculté acidifiante, d'abord exaltée (phénomène d'accoutumance); d'autre part, en culture mixte, l'autolysat favorise *Str. cremoris* dont le développement finit par inhiber la croissance de *Str. citrovorus* — bien que celle-ci soit améliorée en culture pure.

2. *Str. citrovorus* est un **bétacoque**.

En nous inspirant des travaux d'ORLA-JENSEN [7] nous pouvons considérer que les ferments lactiques vrais se divisent en trois groupes :

a) Ferments lactiques donnant de l'acide lactique *dextrogyre* avec des traces de produits accessoires :

Formes rondes : genre streptocoques lactiques ;

Formes bâtonnets : genre streptobactéries.

b) Ferments lactiques donnant de l'acide lactique *levogyre* (ou inactif) avec des traces de produits accessoires :

Formes rondes : néant ;

Formes bâtonnets : genre thermobactéries.

c) Ferments lactiques donnant de l'acide lactique *levogyre* (ou inactif) et des *produits accessoires importants* :

Formes rondes : genre **bétacoques** (acide levogyre) (1) ;

Formes bâtonnets : genre **bétabactéries** (acide inactif) (1).

Str. citrovorus cultivé en lait additionné d'autolysat de levure donne de l'acide lactique en quantité suffisante pour pouvoir être étudié. Or on constate que cet acide est levogyre. Comme d'autre part il donne des produits accessoires importants (acides volatils, CO²...) il n'est pas douteux que *Str. citrovorus* doit être classé dans le genre **bétacoque**.

C'est pourquoi SÖNCKE KNUDSEN [10] l'a baptisé en 1929 *Betacoccus cremoris*.

D'autres auteurs (HUCKER et PEDERSON) [11] ont suggéré l'appellation de *Leuconostoc citrovorus*, pour la raison, sans doute, que les leuconostocs représentent une espèce très importante du genre *betacoccus*. Nous pensons que cette désignation ne doit pas être retenue car les propriétés biochimiques de *Str. citrovorus* sont nettement différentes de celles des leuconostocs. En particulier ceux-ci fermentent les pentoses, ce que ne fait pas *Str. citrovorus*.

La meilleure appellation et la plus précise nous paraît être la suivante :

Betacoccus citrovorus qui rappelle à la fois la position dans la classification et l'une des propriétés principales.

(1) Dénominations créées par Orla-Jensen. Le préfixe *beta* ne représente pas la lettre grecque β mais rappelle les milieux naturels où l'on rencontre souvent certains **bétacoques** : betteraves fermentées, etc. (*beta* = *bette*, *betterave*...).

3. Réponse aux objections que soulève cette classification.

a) *Morphologie*. On peut objecter que *Str. citrovorus* est beaucoup plus grêle que *Str. lactis*. En fait cela dépend des conditions culturales. Le lait est un mauvais milieu pour les bétacoques. En présence d'autolysat de levure *Str. citrovorus* présente un aspect exactement semblable à celui de *Str. lactis*.

b) *Formation de capsules*. *Str. citrovorus* cultivé en lait est encapsulé alors que *Str. lactis* ne l'est pas dans les cultures adultes. En fait, pendant la période d'incubation où il ne forme encore que peu d'acide lactique, *Str. lactis* est, lui aussi, encapsulé. Cet aspect disparaît plus tard sous l'influence de l'acidification. *Str. citrovorus* qui ne produit pratiquement pas d'acide lactique dans le lait pur se trouve donc placé dans les conditions de la phase d'incubation de *Str. lactis*. Il n'y a donc pas de différence à cet égard entre les deux germes.

c) *Formation d'acide acétique*. La faible acidification due à *Str. citrovorus* est uniquement constituée par de l'acide acétique. Ce caractère semblerait l'éloigner des ferments lactiques. Or il y a lieu de noter que les bactéries lactiques affaiblies ou croissant dans des conditions peu favorables — ce qui est le cas de *Str. citrovorus* en lait pur — donnent de l'acide acétique en quantités relativement importantes. D'ailleurs, le classement dans le genre *betacoccus* prévoyait la formation de produits accessoires (dont des acides volatils).

d) *Formation d'anhydride carbonique*. Les streptocoques lactiques ne forment pas de CO_2 . *Str. citrovorus* en forme en culture pure ; mais il y a lieu de noter que ce caractère disparaît peu à peu au fur et à mesure des repiquages. Il ne s'agit donc pas là d'un caractère constant susceptible de servir de base à une classification ni, par conséquent, d'un argument à retenir contre la classification adoptée.

e) *Fermentation de l'acide citrique*. *Str. citrovorus* fermente l'acide citrique, ce que ne font pas les streptocoques lactiques. Or les seules bactéries capables de provoquer cette fermentation d'une façon prononcée appartiennent au groupe des *aerogenes*. Il ne saurait cependant être question de rattacher *Str. citrovorus* à ce groupe dont de grandes différences le séparent par ailleurs. Au reste, on connaît d'autres bétacoques doués de ce pouvoir de fermenter l'acide citrique.

En résumé on peut affirmer que *Str. citrovorus* est bien un bétacoque et qu'il n'y a pas d'objections soutenables à cette classification.

III. Propriétés de *Str. citrovorus*

1. Fermentation des sucres.

Poursuivant l'étude de cette espèce, ORLA-JENSEN a montré qu'elle pouvait fermenter (en milieu optimum à base d'extrait de levure) : le glucose, le galactose, le lactose et le saccharose.

Il est important de noter que *Str. citrovorus* ne s'attaque pas aux pentoses ce qui, avons-nous dit, l'éloigne de certains autres bétaciques (leuconostocs).

En revanche une variété de *Str. citrovorus* (*Str. paracitrovorus* de Hammer) fermente lévulose et maltose, ce que ne fait pas *Str. citrovorus*. Cette variété croît très mal à la température ordinaire et ne joue sans doute aucun rôle dans la pratique.

2. Formation de l'acétylméthylcarbinol (acétoïne).

Les points fondamentaux de la biochimie de *Str. citrovorus* sont les suivants :

a) *Le métabolisme n'est pas le même en milieu neutre et en milieu acide.*

En milieu neutre *Str. citrovorus* donne de l'acide acétique et de l'anhydride carbonique.

En milieu acide il donne, en plus des corps précédents, des corps en C⁴ : acétylméthylcarbinol et, éventuellement, diacétyle ou butylène glycol.

b) *La présence d'acide citrique est indispensable.* Il semble donc que cet acide soit la substance mère des cinq corps énumérés ci-dessus (1).

Ces données importantes découlent notamment des travaux de Van BEYNUM [12]. Il en résulte la conséquence que voici :

Str. citrovorus ne forme l'acétoïne qu'en milieu acide et en présence d'acide citrique (et de sucres).

Plus l'acidité est élevée, plus grande est la quantité d'acétoïne formée (jusqu'à une certaine limite correspondant à l'arrêt du développement microbien). C'est en milieu neutre qu'il se formera le maximum d'acide acétique et CO². Il y a balancement entre les deux groupes de corps formés. On peut donc admettre qu'ils proviennent de la même substance intermédiaire (voir plus loin).

L'acidité nécessaire à la formation de l'acétoïne par *Str. citrovorus* peut être obtenue de différentes manières : association d'une culture lactique très acidifiante ou bien apport pur et simple d'acides

(1) D'ores et déjà nous pouvons signaler que, selon des travaux plus récents, la formation de ces cinq substances dans les milieux sucrés exige la présence d'un accepteur d'hydrogène convenable (Virtanen et Collab.) (13). Dans le cas présent l'acide citrique pourrait être considéré comme l'accepteur indispensable. (Voir plus loin.)

organiques ou minéraux. Ces deux cas méritent un examen particulier car le premier correspond à la base de la technique ancienne (et actuelle) tandis que le second pourrait bien devenir le fondement des techniques futures.

A. Association avec des bactéries lactiques

Nous avons dit que, précisément, les travaux ayant conduit à la découverte de bactéries d'arome avaient démontré la présence d'une telle association dans les levains empiriques réputés aromatiques (*Str. citrovorus* + *Str. cremoris* ou *Str. lactis*).

On peut se demander si les ferments lactiques associés ont, dans ce cas, une influence spécifique autre que leur fonction acidifiante. L'étude systématique des produits de la fermentation mixte a montré que le métabolisme propre des ferments d'arome n'est en rien influencé par les ferments lactiques. L'action favorable des streptocoques lactiques n'est due qu'à l'acidification du milieu qui résulte de leur activité.

Un autre fait corrobore cette déduction : dans les cultures mixtes l'arome n'apparaît qu'à partir d'une certaine acidité. En présence de ferments lactiques et en milieu maintenu neutre, *Str. citrovorus* ne donne pas d'acétoïne.

C'est pourquoi il est venu à l'idée de remplacer la culture purement lactique associée aux ferments d'arome par des apports d'acides dans la culture pure de *Str. citrovorus*.

Cette idée, conçue pour des fins théoriques, présente d'ailleurs une importance pratique considérable — en raison des *inconvenients constatés à l'usage dans l'emploi des cultures mixtes* :

Il est en effet difficile de découvrir la souche de *Str. lactis* ou *cremoris* la plus convenable à l'association et plus difficile encore de maintenir cette association une fois créée. Certaines souches de streptocoques lactiques ne conviennent absolument pas, pour plusieurs raisons dont les principales sont : leur aptitude à détruire rapidement l'acétoïne formée, leur tendance à s'opposer à une bonne croissance des ferments d'arome, les variations qu'elles présentent dans le temps en ce qui concerne leur faculté acidifiante. Les bons levains ne peuvent donc être composés que par la sélection empirique des meilleurs combinaisons (Van BEXNUM). Même lorsqu'une bonne combinaison a été réalisée, elle risque d'évoluer rapidement dans un sens défavorable.

DAVIES [14] insiste sur la nécessité de réaliser et surtout de maintenir une certaine distribution entre les éléments du mélange.

VAS et CSISZAR ont montré le caractère précaire de semblables associations et mis l'accent sur les résultats décevants auxquels, le plus souvent, elles conduisent [15].

Ces diverses raisons pratiques renforcent l'intérêt qui s'attache du point de vue théorique à étudier l'acidification nécessaire par des moyens purement chimiques.

B. Acidification des cultures par apport d'acides

a) *Acide lactique*. Si, comme cela semble démontré, le rôle des ferments lactiques dans les associations précédentes se borne uniquement à produire l'acidité nécessaire à la formation de l'acétoïne, le même résultat peut être obtenu par l'apport d'acide lactique dans la culture pure de *Str. citrovorus*. L'expérience a pleinement confirmé cette manière de voir : dans du lait préalablement acidifié par un apport d'acide lactique, les ferments d'arome cultivés seuls donnent de l'arome dès que le développement des cellules est devenu suffisant (l'acidité, d'ailleurs, favorise la croissance de *Str. citrovorus*).

Il convient de signaler qu'il y a, à cet égard, des différences entre les diverses souches de ferments d'arome. Pour fixer les idées mentionnons, d'après Van BEYNUM [16] :

Qu'en-dessous de 3 gr. 6 d'acide lactique par litre il ne se forme pas d'arome (milieu insuffisamment acide) ;

Qu'au-dessus de 7 grammes par litre, il ne s'en forme plus (le développement des bactéries d'arome est entravé par l'acidité) ou seulement très lentement.

La formation d'arome est vraiment nette aux acidités qui correspondent à la coagulation du lait à froid.

Ces faits éclairent certains des accidents constatés dans l'emploi des cultures mixtes :

Les ferments lactiques ordinaires se développent jusqu'à 6 gr. 3-6 gr. 8 d'acide lactique par litre, mais continuent à élever l'acidité jusqu'à un certain point final (8-9 gr. d'acide lactique par litre) (1).

Les bactéries d'arome croissent encore quand les ferments lactiques ne se développent plus (entre 7 et 9 gr. d'acide lactique) mais cessent à leur tour de se développer et de produire de l'acétoïne. Si, donc, dans les cultures mixtes, les ferments lactiques associés produisent trop rapidement le maximum possible d'acidité dont ils sont capables, la production d'acétoïne, donc d'arôme, s'arrête prématurément.

b) *Autres acides*. D'autres acides que l'acide lactique ont été utilisés avec succès : acide tartrique, acide sulfurique (certains acides ne conviennent pas, sans doute à cause d'une action toxique spécifique).

(1) Notons, en passant, que cet accroissement de l'acidité dans une zone où il n'y a plus d'accroissement du nombre de germes semble bien indiquer que la fermentation lactique s'achève par voie purement diastasique.

Mais il y a lieu de noter que c'est seulement dans le cas du lait que cette addition d'acides (quels qu'ils soient) réussit. Dans les milieux artificiels sucrés *dépourvus d'acide citrique* la création d'un pH acide ne suffit pas à entraîner l'apparition de l'acétoïne. De même, dans le lait où l'on a préalablement détruit l'acide citrique naturel sans former d'acétoïne (par exemple par fermentation du *citrovorus* en milieu neutre), l'apport d'acide, même lactique, ne permet pas la formation d'acétoïne. *Il n'y a exception, dans tous les cas, que si l'acide introduit est l'acide citrique.* Les milieux artificiels sucrés, additionnés d'acide citrique sont le siège d'une production d'acétoïne au même titre que le lait (si l'acidité est suffisante).

Ces observations nous ramènent donc au deuxième principe fondamental énoncé plus haut : la présence d'acide citrique (en même temps que celle d'une acidité convenable) est indispensable à l'apparition de l'acétoïne.

C. Cas particulier de l'addition d'acide citrique

Les faits rappelés ci-dessus confirment que l'acétoïne provient bien (directement ou indirectement) de l'acide citrique ou du moins que la présence de l'acide citrique est indispensable à la formation de cette substance.

Il convient donc d'étudier les conditions de la décomposition de l'acide citrique par *Str. citrovorus*.

HAMMER avait montré dès 1920 [17] que les bactéries d'arôme décomposaient l'acide citrique en donnant des acides volatils. Beaucoup plus tard divers auteurs ont précisé le catabolisme de cet acide. Nous avons rappelé plus haut les travaux de VAN BEYNUM [12] montrant à quels produits de décomposition on avait affaire en milieu neutre et en milieu acide. Ces résultats ont été confirmés par ceux de RUMMENTS [18] qui a montré l'attaque rapide de l'acide citrique par *Str. citrovorus* même en milieu neutre, et la formation d'acétoïne seulement en milieu acide.

Influence de l'acidité sur la décomposition de l'acide citrique et l'apparition de l'acétoïne :

D'après RUMMENTS on observe les taux de destruction suivants par *Str. citrovorus* en 24 heures (acidification par introduction d'acide lactique) : à pH 5,8, 60 % ; à pH 5,3, 90 % ; à pH 4,8, 99 %.

Cette acidité est cependant encore insuffisante à provoquer l'apparition de l'acétoïne.

Le pH de 4,8 représente à peu près la limite supérieure au-dessous de laquelle il faut descendre pour former l'acétoïne — à moins qu'il y ait un apport important d'acide citrique ou que l'acidité requise soit produite par l'acide citrique lui-même (dans ce cas on a déjà une légère formation d'acétoïne à pH 5,3-5,0...). Dans

tous les autres cas, il faut acidifier à des pH nettement inférieurs pour provoquer la formation d'acétoïne (pH 4,3 par exemple). MICHAELIAN et ses Collaborateurs [19] confirment que l'optimum d'acidité pour la formation de l'acétoïne est compris en pH 4,0 et pH 4,3. D'une manière plus générale la zone pH 3 à 4,6 est la zone favorable. Comme on le voit, il s'agit d'acidités relativement élevées qui sont rarement atteintes dans la maturation des crèmes et qui sont même parfois, à d'autres titres, déconseillées. Pour le problème qui nous intéresse ici, elles s'avèrent indispensables.

Remarques :

Les considérations précédentes donnent la raison des échecs constatés dans un apport pur et simple de petites quantités d'acide citrique à des levains dont l'acidité finale n'atteint pas le pH optimum.

En revanche elles donnent l'explication de la réussite que l'on obtient lorsque l'addition d'acide citrique est telle qu'on atteigne du même coup le pH convenable (ce qui advient avec 5 grammes d'acide citrique par litre).

Certains auteurs déclarent avoir obtenu de bons résultats avec 1-2 grammes par litre, sans doute à la suite d'une acidification suffisante (VAS et CSISZAR) [15]. D'ailleurs la quantité d'acide citrique plus citrates normalement présents dans le lait est très largement suffisante. Le seul problème consiste à amener l'acidité au point voulu.

Sur le terrain pratique il résulte de tout cela que la technique la plus convenable pourrait être la suivante : acidifier le lait par un apport d'acide sulfurique dilué jusqu'à la zone de pH convenable, puis l'ensemencer massivement avec une culture pure de *Str. citrovorus*. Un léger apport d'acide citrique dans certaines crèmes riches en matière grasse (c'est-à-dire pauvres en lait) serait sans doute avantageux.

(Il va de soi que pendant la fermentation, l'acidité, loin de s'accroître, ne pourra que décroître légèrement par suite de la disparition de l'acide citrique naturel du lait.)

3. Destruction de l'acétylméthylcarbinol.

De nombreux auteurs sont d'accord pour affirmer que les bactéries d'arôme possèdent la propriété de détruire l'acétoïne qu'elles ont formée (HAMMER, MICHAELIAN et Coll., STAHLY, SLATTER, BARNICOAT, etc.) [20, 19, 21, 22].

a) Le mécanisme de cette disparition serait une réduction de l'acétoïne en butylène-glycol :

Dans tous les cas la quantité de butylène-glycol formé correspond à la quantité d'acétoïne disparue.

Là encore l'influence du pH du milieu serait prépondérante : en milieu neutre (ou neutralisé après la formation d'acétoïne) on assiste à la disparition rapide de l'acétoïne, laquelle, au contraire, est relativement *stable en milieu acide*. MICHAELIAN pense qu'il peut y avoir production et destruction simultanées d'acétoïne, la quantité présente à tout moment n'étant que la résultante de ces deux processus.

b) *La cause* de cette réduction serait à rechercher dans l'activité des cellules elles-mêmes. Les hautes acidités et les basses températures retardant l'accroissement du nombre des germes, représentent des conditions favorables à la stabilité de l'acétoïne alors que les faibles acidités et les températures relativement élevées (20°) qui accélèrent la multiplication des cellules, correspondraient à des conditions très défavorables entraînant une destruction rapide de l'acétoïne.

Le remède à cette situation serait donc simple dans la pratique : travailler en milieu très acide et refroidir fortement les cultures après la formation de l'acétoïne.

D'autres germes que *Str. citrovorus* lui-même sont capables de réduire l'acétoïne en butylèneglycol (groupe *Echerichia aerobacter*, bactéries fluorescentes, sporulés aérobies, etc.). Les conséquences technologiques sont faciles à déduire : éviter la contamination des cultures par ces germes indésirables.

Il y a lieu enfin de noter que certaines souches de streptocoques lactiques possèdent à un haut degré la propriété de réduire l'acétoïne. C'est l'une des raisons qui ont été invoquées contre l'emploi des cultures mixtes. Elle est évidemment de nature à expliquer certains échecs enregistrés dans la mise en œuvre de cette technique.

4. Formation du diacétyle.

Nous avons dit au début de cette étude que le diacétyle (qui est la véritable substance aromatique, l'acétoïne pure étant inodore et sans saveur) provenait en général de l'oxydation de l'acétylméthylcarbinol. De nombreux faits plaident en faveur de cette conception (aération des cultures, des crèmes, barattage en présence d'air, etc.).

Cependant certains auteurs (Van BEYNUM, VIRTANEN) [16, 23] pensent que le diacétyle peut également résulter d'un processus fermentaire au même titre que l'acétoïne et parallèlement à cette dernière, à la condition que la culture soit strictement oxybiotique.

En fait, dans les cultures de *Str. citrovorus* menées en anoxybiose

il se forme de l'acétoïne et jamais de diacétyle alors qu'en oxybiose on constate la présence simultanée de ces deux substances.

Il est évidemment extrêmement difficile de distinguer la part qui revient au phénomène oxydatif de celle qui correspond au processus purement fermentaire.

Les recherches entreprises dans ce domaine ont néanmoins montré :

Que la production biologique du diacétyle (par voie fermentaire) exige des conditions strictement oxybiotiques, d'où il résulte que le diacétyle n'apparaît, dans une culture, qu'au début de la fermentation (c'est-à-dire avant que tout l'oxygène dissous ait été consommé) et ne peut continuer à se former que si la culture est agitée souvent ou mieux encore oxygénée par barbotage d'air (DAVIES, VIRTANEN, MOHR) [14, 23, 24] ;

Que l'oxydation de l'acétoïne en diacétyle peut se produire par voie biologique. Dans ce cas la moitié des molécules d'acétoïne sont oxydées en diacétyle, l'autre moitié étant réduites en butylène-glycol ;

Que cette oxydation peut se faire aussi par voie physicochimique (autoxydation sous l'influence de peroxydes, oléiques notamment) ;

Que la formation fermentaire du diacétyle est toujours faible vis-à-vis de celle de l'acétoïne dans les conditions courantes de faible aération. Le rapport diacétyle/acétoïne = 1/20 environ. (Dans une bonne culture mixte normale ayant acquis une acidité de 70-75° Dornic, les teneurs courantes sont comprises : pour le diacétyle entre 1 mgr. 5 et 2 mgr. 5 par litre et pour l'acétoïne entre 25 et 55 mgr., parfois davantage) ;

Que, au cours du barattage, un processus oxydatif rapide intervient certainement et se poursuit dans les heures qui suivent (1) ;

Qu'il n'est pas exclu qu'un processus fermentaire augmente aussi ultérieurement la teneur en diacétyle du beurre grâce aux aliments résiduels du non beurre.

Il semble donc bien difficile de ne pas accepter ces deux origines possibles du diacétyle : *origine directe* par voie fermentaire en oxybiose, *origine indirecte* par oxydation de l'acétoïne.

Il nous paraît cependant nécessaire que de nouvelles recherches soient entreprises pour préciser les conditions de ces deux processus dont certains points sont encore obscurs. (On peut se demander notamment si l'origine fermentaire est bien indiscutable ou si elle ne devrait pas être ramenée simplement à une oxydation immédiate de l'acétoïne formée. On n'a pas encore produit, à notre

(1) Ce qui constitue une condamnation (sous le rapport de l'arôme) des techniques de barattage en gaz inerte (Virtanen).

connaissance, de diacétyl par voie biologique sans voir apparaître en même temps de l'acétylméthylcarbinol.)

5. Destruction du diacétyl.

Dans les cultures, dans les crèmes et dans le beurre, la disparition du diacétyl formé est un fait certain, au même titre que celle de l'acétoïne.

Deux mécanismes principaux sont envisagés pour l'expliquer :

Réduction en acétoïne (puis en butylèneglycol) sous l'influence des ferments d'arome eux-mêmes — et d'autres germes réducteurs. Tout ce qui a été dit de la cause et du mécanisme de la disparition de l'acétoïne trouverait sa place ici.

Oxydation en substances non aromatiques (DAVIES) [14] sous l'influence de causes non déterminées (oxygène, bactéries oxydantes, peroxydes...) et par des mécanismes non encore élucidés.

Quoi qu'il en soit de la manière dont le diacétyl disparaît, cette disparition est un fait qui se traduit ainsi :

A 20° la teneur du beurre en diacétyl ne reste constante que pendant quelques jours et diminue ensuite.

A 10° on constate d'abord un accroissement suivi d'une chute après 12 jours environ.

A 0° (et même — 10°) la teneur reste constante pendant 10-12 jours pour diminuer et disparaître ensuite.

Il résulte de ces observations qu'il semble très difficile de maintenir un arôme prononcé dans les beurres de conservation. Le diacétyl disparaît toujours au cours du stockage (avant même que n'apparaissent d'autres défauts).

On peut donc affirmer avec VIRTANEN que le problème de la conservation de l'arôme au cours du stockage n'est pas résolu. On serait tenté d'en déduire que, en l'état actuel des choses, il est inutile de rechercher des techniques permettant la production d'un grand arôme dans le cas des beurres destinés à la conservation et qu'il y a lieu de concentrer ces efforts uniquement en vue de fabrication de beurres de consommation immédiate ou de conservation très limitée.

Il y a lieu toutefois de retenir que le seul moyen de retarder, sinon d'empêcher totalement l'évanouissement de l'arôme, est la conservation à de très basses températures qui bloquent toute activité bactérienne.

IV. Production de l'acétoïne et du diacétyl par d'autres germes que *Str. citrovorus*

La production des substances aromatiques n'est pas l'apanage des germes qui utilisent l'acide citrique. De nombreux autres

microorganismes font apparaître l'acétoïne ou son produit de réduction (butylèneglycol) ou son produit d'oxydation (diacétyl) (1)

1. Microorganismes n'appartenant pas à la classe des ferments lactiques.

Sans entrer dans le détail nous mentionnerons seulement que la fermentation butylèneglycolique très répandue dans la nature donne naissance à ces substances (travaux de LEMOIGNE) [26]. Il en est de même de la fermentation acétonobutylique, de la fermentation butyrique où l'acétoïne se rencontre à côté des produits principaux de ces fermentations.

Il est très important de noter que les microorganismes correspondants (2) ne forment pas l'acétoïne à partir de l'acide citrique, mais à partir de sucres — voir même à partir de la cellulose — ce qui a permis d'émettre l'hypothèse que l'acide citrique, nécessaire à la formation de l'acétoïne par *Str. citrovorus* n'en serait cependant pas la substance mère (VIRTANEN) [13].

On peut aller jusqu'à penser que l'acétoïne aurait dans tous les cas, comme origine commune, les glucides (3).

2. Streptocoques lactiques producteurs d'acétoïne.

Indépendamment de ces germes inutilisables dans la maturation des crèmes (4) il convient de noter que certains ferments lactiques — autres que *Str. citrovorus* — possèdent cette propriété de donner de l'acétoïne. Ces germes, qui ne sont pas des bétacoques mais des variétés de streptocoques lactiques, produisent en même temps une fermentation lactique véritable qui conduit aux acidités favorables à la formation de l'acétoïne. Ils se comportent donc, à eux seuls, comme les cultures mixtes dont il a été parlé et dont ils ont les avantages sans en présenter les inconvénients.

Parmi ces germes nous devons citer : *Str. aromaticus* et *Str. citrophilus* (Van BEYNUM) [28], *Str. diacétillactis* (MATUZIEWSKI) [29].

Certaines souches de *Str. cremoris* (Van NIEL) [3], et même certaines souches de *Str. lactis* (VAS et CSISZAR, ORLA-JENSEN et HANSEN, Van BEYNUM) [15, 30, 16].

Selon VAS et CSISZAR ces dernières seraient abondamment repré-

(1) On rencontre également le diacétyl dans certaines circonstances qui n'impliquent pas nécessairement l'intervention de microorganismes (café torréfié, fumée de tabac, miel...) (*Schmalzuss et Barthmeyer*) (25).

(2) Parmi lesquels on peut citer : *Lactis aerogenes*, *B. subtilis*, *B. cloacae*, etc.

(3) On a établi que certains streptocoques fécaux (*Str. liquefaciens*, *Str. fecalis*) forment du diacétyl à partir du glucose (*J. G. Davis et Collab.*) (27).

(4) On a cependant recommandé, à la fin du siècle dernier d'utiliser certaines bactéries d'arôme appartenant au groupe *Coli* pour provoquer la maturation aromatique des crèmes en liaison avec des ferments lactiques (*Orla-Jensen*) (8).

sentées dans la nature. Ces auteurs en reconnaissent jusqu'à 10% parmi les streptocoques lactiques banaux.

Du point de vue physiologique il a été démontré par RUMMENTS [18], confirmé par Van BEYNUM [16], puis par RITTER [31] que les streptocoques lactiques producteurs d'arome n'attaquent absolument pas l'acide citrique et forment l'acétoïne à partir du glucose (résultant de l'hydrolyse du lactose) (1).

Pour MICHAELIAN [19] ces streptocoques lactiques spéciaux ne seraient que des *Str. cremoris*, ce qui pourrait être établi par l'examen des propriétés biochimiques : *Str. lactis* fermente la dextrine, ce que ne fait pas *Str. cremoris*.

VAS et CSISZAR qui ont particulièrement insisté sur l'importance pratique de ces espèces productrices d'arome font remarquer toutefois la variabilité de cette faculté d'une souche à l'autre et parfois son inconstance pour une souche donnée. Toutefois une sélection rigoureuse et l'application de conditions culturelles favorables permettent d'obtenir des souches hautement aromatiques, capables de manifester cette propriété d'une façon très régulière et de la maintenir pendant plusieurs années.

S'il est exact que ces variétés aromatiques de *Str. lactis* (ou *Str. cremoris*) soient aussi répandues que le pensent VAS et CSISZAR, on pourrait être tenté d'associer de nombreuses souches quelconques de ces germes dans l'espoir que l'une au moins d'entre elles sera productrice d'acétoïne.

Il ne peut absolument pas être procédé ainsi car, comme le font remarquer VAS et CSISZAR, parmi les souches non aromatiques il en existe (et de très nombreuses) qui possèdent une force de destruction marquée vis-à-vis de l'acétoïne. Il faut absolument isoler les souches aromatiques avec soin, les sélectionner et les entretenir en culture pure à l'abri de toute contamination.

Il y a là des faits de la plus haute importance puisque l'usage de ces germes spéciaux permettrait de résoudre entièrement le problème de la formation de l'arome sans avoir recours aux cultures mixtes, ni même aux artifices d'acidification dans le cas de l'emploi de *Str. citrovorus* en culture pure.

Seule, l'expérience permettra de trancher entre ces deux formules destinées à remplacer dans l'avenir les cultures mixtes actuellement en usage :

Emploi de *Str. citrovorus* avec acidification chimique du milieu ;

Emploi de variétés aromatiques de streptocoques lactiques.

(A suivre.)

(1) Il y a exception pour *Str. citrophilus* (Van Beynum) qui attaque l'acide citrique en même temps qu'il acidifie le lait et se conduit comme un mélange *Str. citrovorus* + *Str. lactis*.