LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :

- R. CHEVALIER, E. LEFEBVRE
et J. AUCLAIR. — Thermo-
résistance d'un strepto-
coque lactique producteur
de nisine 1
- S. KUZDZAL-SAVOIE ET G.
MOCQUOT. — Observations
sur les qualités organolep-
tiques du lait (*fin*) 11

SUPPLÉMENT TECHNIQUE :

- G. GÉNIN. — L'emploi de la
caséine dans la préparation
d'agents renforçants pour
caoutchouc 44

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

- 1^o Les livres 60
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 72
- 3^o Brevets 108

BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :

- 1^o Les livres 110
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 112

DOCUMENTS ET INFORMATIONS :

- Laits aromatisés emprésurés . 117
- Le marché français en 1959 . 118
- Les stocks de beurre métro-
politain 124
- Le marché des fromages en
Belgique-Luxembourg . . 125
- Le lait en Grande-Bretagne . 126
- Exportations 126
- Industrie laitière norvégienne
en 1958 127
- Communiqué 127
- Service d'information lacto-
logique 128
- Froid et lait 128

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

THERMORÉSISTANCE D'UN STREPTOCOQUE LACTIQUE PRODUCTEUR DE NISINE

par

R. CHEVALIER, ELISABETH LEFEBVRE et J. AUCLAIR

Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières, C.N.R.Z.
Jouy-en-Josas (S.-et-O.)

INTRODUCTION

Les streptocoques lactiques producteurs de nisine ont été utilisés avec succès dans plusieurs fabrications fromagères (fromage fondu [1], Edam [2]) en vue de lutter contre le développement, dans le fromage, des bactéries anaérobies sporulées responsables de gonflements en cours d'affinage ou de conservation.

Mais l'utilisation de levains producteurs de nisine pour la fabrication des fromages à pâte cuite (Gruyère ou Emmental) se heurte,

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

entre autres, à la difficulté suivante : les streptocoques lactiques producteurs de nisine ne résistent pas, ou mal, au chauffage normalement pratiqué dans ce type de fabrication.

Dans le présent travail, nous avons recherché dans quelle mesure il était possible d'obtenir une souche thermorésistante de streptocoques lactiques producteurs de nisine, susceptible d'être utilisée éventuellement comme levain pour la fabrication du Gruyère.

I. — OBTENTION D'UNE SOUCHE THERMORÉSISTANTE DE STREPTOCOQUES LACTIQUES PRODUCTEURS DE NISINE

Une souche de *Streptococcus lactis* bonne productrice de nisine, T 13 B, a été soumise à une série de chauffages alternant avec des périodes d'incubation à 30° C grâce à un bain-marie spécialement conçu à cet effet.

Cet appareil était constitué essentiellement par un bain d'eau dont la température variait automatiquement suivant un « programme » établi à l'avance. La figure 1 montre, en exemple, la courbe de température relevée au cours d'un essai où une culture était soumise à des chauffages de 30 mn à 55,5° C alternant avec des périodes d'incubation de 12 h à 30° C.

Fig. 1. — Diagramme de température montrant le traitement appliqué à la souche T 13 B et consistant en une série de chauffages à 55,5° C pendant 30 mn, séparés par des périodes d'incubation de 12 h à 30° C.

La souche T 13 B soumise à ce traitement était cultivée sur lait tournesolé. La température, la durée des chauffages et la durée des périodes d'incubation avaient été choisies après des essais pré-

liminaires de façon à ce que l'effet létal du chauffage équilibre, à peu près exactement, la croissance microbienne au cours de l'incubation. De cette manière, la production d'acide lactique pendant l'incubation était faible ou nulle et le lait, qui servait à la fois de milieu de culture et de milieu de chauffage, pouvait subir sans coaguler, plusieurs dizaines de chauffages et d'incubations successives.

Mode opératoire

Un flacon de 100 ml de lait écrémé tournesolé autoclavé (118° C, 20 mn) étaitensemencé à raison de 5 p.100 à l'aide d'une culture fraîche de la souche à essayer (culture de 16 h sur lait tournesolé, incubée à 30° C). Le flacon était placé au bain-marie à 30° C jusqu'à ce que le tournesol présente un début de réduction (environ 2 h). A ce moment le laitensemencé était réparti en tubes de 18 × 180mm à raison de 15 ml par tube. Ces tubes étaient placés dans l'appareil de chauffage, et le premier chauffage était déclenché.

Les tubes étaient retirés successivement du bain-marie après le nombre voulu de chauffages. Ils étaient placés au bain-marie à 30° C jusqu'à coagulation. On déterminait alors la concentration en nisine des cultures ainsi obtenues. Ces cultures pouvaient servir, éventuellement, de point de départ pour une nouvelle série de chauffages.

TABLEAU I

VARIATIONS DE LA PRODUCTION DE NISINE DE LA SOUCHE *STR. LACTIS* T 13 B, LORSQU'ELLE EST SOUMISE A DES CHAUFFAGES RÉPÉTÉS A 55,5° C PENDANT 30 MN

Nombre de chauffages	0	1	10	20	31	37	40	50
Production de nisine (Unités Reading par ml de culture)	390	390	780	976	976	780	780	390

Dosage de la nisine

La nisine était dosée par dilution en milieu liquide avec *Str. cremoris* 1 P 5 comme organisme-test.

Résultats

La souche d'origine T 13 B est généralement détruite par deux chauffages à 56° C pendant 30 mn, séparés par une incubation de 12 h à 30° C, mais cette même souche résiste à 50 chauffages à 55,5° C pendant 30 mn, alternant également avec des périodes d'incubation de 12 h à 30° C. Des cultures ayant subi un nombre

variable de chauffages à 55,5° C montrent une production de nisine qui augmente avec le nombre des chauffages, puis diminue ensuite (Tableau I).

Si l'on prend une culture ayant subi un certain nombre de chauffages à 55,5° C (par exemple 20 chauffages à 55,5° C pendant 30 mn, alternant avec des périodes d'incubation de 12 h), et qu'on la soumette à une série de chauffages à 56° C, on constate que la culture n'est pas détruite après 30 chauffages à cette dernière température.

Ceci montre qu'une culture soumise à des chauffages répétés, à une température sub-létale acquiert rapidement une thermorésistance qui lui permet de survivre à des chauffages auxquels elle ne résistait pas primitivement.

Nous avons cherché à augmenter cette thermorésistance en soumettant notre culture à des chauffages répétés dont on augmentait la température ou la durée. Nous avons ainsi obtenu une souche qui résistait à 10 chauffages à 56,5° C pendant 45 mn (séparés par des périodes d'incubation de 12 h). Elle acidifiait normalement le lait et produisait de la nisine en quantité comparable à la souche d'origine. Il n'a pas été possible de dépasser ce degré de thermorésistance.

II. — PROPRIÉTÉS DE LA SOUCHE THERMORÉSISTANTE OBTENUE

La souche thermorésistante obtenue T 13 BR a été comparée, du point de vue de sa thermorésistance, d'une part à la souche d'origine T 13 B, d'autre part à 3 souches appartenant à des espèces naturellement thermorésistantes : *Str. faecalis*, *Str. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*. Nous avons utilisé pour cela, la méthode de détermination du temps de réduction décimale (« Decimal reduction time ») [3] en utilisant une technique semblable à celle de WHITE [4] [5].

Méthode de mesure de la thermorésistance

La souche à étudier était normalement entretenue sur lait autoclavé tournesolé. En vue de l'essai, la souche était repiquée 2 fois sur bouillon glucosé [6] à raison de 0,5 p. 100 et incubée à 30° C, jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique de 0,22, mesurée au colorimètre « Lumetron », dans des tubes calibrés de 18 mm de diamètre. Cette densité optique était atteinte en général, après 15 à 16 heures d'incubation et correspondait à la fin de la phase logarithmique de croissance des bactéries. C'est à ce stade de croissance que la thermorésistance des bactéries est maximum [7], [8]. 0,5 ml de la culture était ajouté à une fiole contenant

50 ml de lait écrémé autoclavé (114°C , 10 mn) maintenue dans un bain-marie réglé à $60^{\circ}\text{C} \pm 0,1$. A des intervalles de temps variables, on prélevait des échantillons sur lesquels on déterminait le nombre de survivants par dénombrement sur milieu glucosé, après incubation à 30°C pendant 3 jours, 2 boîtes étantensemencées pour chaque échantillon.

Comparaison de la souche thermorésistante avec la souche d'origine

Fig. 2. — Courbes de mortalité obtenues avec la souche T 13 B (A) et avec la même souche rendue thermorésistante T 13 BR (B). Température de chauffage : 60°C .

La figure 2 montre un exemple des résultats obtenus au cours de plusieurs essais effectués sur la souche thermorésistante et la souche d'origine.

Avec la souche d'origine, on observe une chute rapide du nombre des survivants dès le début du chauffage ; le nombre des germes restant après 30 mn de chauffage est, en général, inférieur à 10 par ml. Par contre, avec la souche thermorésistante, on observe une destruction rapide des germes seulement après 5 mn de chauffage ; le nombre des survivants, après 20 mn de chauffage varie, en général, entre 100 et 10 000 par ml, et ce nombre reste alors sensiblement constant quand on poursuit le chauffage jusqu'à 60 mn.

Nous avons cherché à voir si les germes résistant au chauffage avaient conservé leur aptitude à produire de la nisine et s'ils présentaient une thermorésistance supérieure à la souche T 13 BR étudiée. Pour cela, nous avons repiqué, à partir d'une boîte de Pétri ayant servi à la numération des germes survivant à 60 mn de chauffage, une dizaine de colonies, et nous avons déterminé sur les cultures obtenues, la production de nisine. Toutes ces cultures produisaient de la nisine en quantité sensiblement égale à celle de la culture d'origine. Nous avons établi la courbe de mortalité par chauffage d'une de ces cultures. Cette courbe coïncidait avec celle de la souche T 13 BR.

Nous avons vu précédemment que, par notre procédé de culture et de chauffages intermittents, la souche T 13 BR avait acquis une thermorésistance qu'il n'était pas possible d'augmenter par de nouveaux chauffages. Nous avons constaté de même que la courbe de mortalité de notre souche thermorésistante n'était pas modifiée lorsque cette souche était soumise à une série de 15 chauffages supplémentaires à 56° C pendant 45 mn, séparés par des périodes d'incubation de 12 h. Ceci montre que la souche T 13 BR avait atteint une thermorésistance limite qu'il n'était pas possible de dépasser.

Fig. 3. — Courbes de mortalité obtenues avec : *Str. faecalis* PP' 6 (A) ; *Str. thermophilus* T J (B) ; *L. bulgaricus* C.N.R.Z. 36 (C). — Température de chauffage : 60° C.

Comparaison avec des espèces naturellement thermorésistantes

Les courbes de mortalité ont été établies pour les souches suivantes : *Str. faecalis* P P'6, *Str. thermophilus* T J, *L. bulgaricus* C.N.R.Z. 36.

Ces souches habituellement entretenues sur lait tournesolé, étaient repiquées 2 fois en vue de l'essai : *Str. faecalis* était repiqué sur bouillon glucosé [6] et incubé à 37° C ; *Str. thermophilus* sur bouillon glucosé [6] et incubé à 37° C ; *Str. thermophilus* sur bouillon lactosé [9] incubé à 42° C et *L. bulgaricus* sur bouillon de Briggs [10] incubé à 37° C.

La méthode utilisée était la même que pour *Str. lactis* T 13 B, le dénombrement des survivants étant effectué sur les milieux gélosés de même composition que les milieux ayant servi aux repiquages.

La figure 3 montre un exemple des résultats obtenus. On observe une destruction très lente des germes pour *Str. faecalis* et *L. bulgaricus* et pas de destruction pour *Str. thermophilus*.

Maintien de la thermorésistance au cours des repiquages

Nous avons cherché à voir s'il était possible de maintenir, au cours de repiquages successifs effectués à 24 h d'intervalle sur lait autoclavé, la thermorésistance de la souche T 13 BR en même temps que sa production de nisine. Nous avons constaté que la production de nisine commençait à diminuer entre les douzième et quinzième repiquages, et disparaissait complètement vers le vingtième repiquage.

Les courbes de mortalité établies au cours de ces repiquages successifs, ont montré que la thermorésistance de la souche se maintenait toujours au-delà de la production de nisine, aucune variation n'étant observée dans la courbe de mortalité après 20 à 25 repiquages.

DISCUSSION

Les courbes de mortalité de T 13 B et de T 13 BR sont à rapprocher de celles obtenues par NIVEN, BUETTNER et EVANS [11] avec certains lactobacilles responsables de la détérioration des conserves de viande. Une souche thermolabile de lactobacilles étudiée par ces auteurs présentait une courbe de mortalité semblable à celle de T 13 B tandis que les courbes de mortalité des

souches thermorésistantes de lactobacilles ressemblaient aux courbes de mortalité que nous avons obtenues avec les espèces *Str. faecalis*, *Str. thermophilus* ou *L. bulgaricus*.

La courbe de mortalité de T 13 BR représente un intermédiaire entre ces deux formes de courbe. On peut la décomposer en trois portions : a) une portion horizontale, qui constitue une « phase de latence » ; b) une portion de droite correspondant à une phase de destruction logarithmique des germes constituant la majorité de la population microbienne et c) une portion de courbe, de pente très faible, correspondant à une destruction lente des germes les plus thermorésistants.

La détermination du temps de réduction décimale (D.R.T.) pour les cultures T 13 B et T 13 BR ne permet pas de distinguer ces deux souches : en effet, 9 mesures de D.R.T. sur T 13 B et 16 mesures sur T 13 BR ont donné les valeurs suivantes :

Pour T 13 B : 1,6 - 3,1 - 3,3 - 2,1 - 2,6 - 3,0 - 2,2 - 3,0 - 2,9.
Moyenne 2,6.

Pour T 13 BR : 2,3 - 1,9 - 4,0 - 1,8 - 2,8 - 2,0 - 2,6 - 4,1 - 4,1 - 3,3 - 3,5 - 2,1 - 2,6 - 2,4 - 3,1 - 2,6. Moyenne 2,8.

On voit que les valeurs de D.R.T. obtenues pour les deux souches, sont, pratiquement, semblables, compte tenu des variations importantes qu'elles présentent pour une même souche.

Les valeurs de D.R.T. obtenues avec la souche T 13 B sont dans l'ensemble, supérieures aux valeurs trouvées par WHITE [4] pour trois souches de *Str. lactis*, mais, là encore, les variations observées pour une même souche, sont trop importantes pour pouvoir tirer une conclusion sûre ; d'autre part, les conditions expérimentales de nos essais n'étaient pas tout à fait identiques à celles de WHITE.

En fait, la mesure de D.R.T. d'une culture donne la pente de la courbe de mortalité dans la portion où la destruction des germes est logarithmique. Cette détermination constitue vraisemblablement, plutôt une mesure de l'hétérogénéité de la culture (proportion relative des cellules thermorésistantes et des cellules thermolabiles), qu'une mesure du degré de thermorésistance proprement dit.

D'après les courbes de mortalité obtenues à 60° C. pour T 13 B et T 13 BR, on peut dire que T 13 BR est plus thermorésistante que T 13 B, en raison d'une part, de l'existence d'une période de latence précédant la phase de destruction logarithmique des germes les plus sensibles de la souche T 13 BR, et d'autre part, d'une proportion beaucoup plus importante chez cette même souche de cellules particulièrement thermorésistantes dont la destruction est très lente.

La thermorésistance acquise par la souche T 13 BR est relati-

vement limitée ; elle correspond à une différence de température d'environ 1° C avec la thermorésistance de la souche T 13 B. Le fait que les cultures provenant des cellules les plus thermorésistantes de la souche T 13 BR (cellules ayant résisté à 60 mn de chauffage à 60° C) donnent des courbes de mortalité semblables à celles de T 13 BR est en accord avec les résultats de NIVEN, BUETTNER et EVANS [11] d'après lesquels les cultures des lactobacilles les plus thermorésistants contiennent toujours une proportion plus ou moins importante de cellules thermolabiles.

Ces résultats peuvent sans doute s'interpréter, dans une certaine mesure, grâce à la théorie de YUDKIN [12], par le mécanisme de « variation clonale et sélection ». Il semble bien cependant que, contrairement aux autres formes d'adaptation (adaptation aux antibiotiques, par exemple), le caractère de thermorésistance d'une souche donnée de bactéries ne puisse être modifié de façon importante, tout au moins dans les conditions de culture du laboratoire.

RÉSUMÉ

En soumettant une souche de streptocoques lactiques productrice de nisine à des chauffages répétés à 55,5° C, il a été possible d'augmenter légèrement la thermorésistance de cette souche, tout en lui conservant sa faculté de produire de la nisine.

La courbe de mortalité à 60° C de la souche thermorésistante ainsi obtenue, est intermédiaire entre les courbes de mortalité observées d'une part avec la souche originale, d'autre part avec des souches de bactéries normalement thermorésistantes (*Str. faecalis*, *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus*).

La détermination du « temps de réduction décimale » d'une souche de bactéries comme mesure de sa thermorésistance, est discutée.

SUMMARY

Thermoresistance of a nisin-producing streptococcus

By repeatedly heating to 55,5° C a strain of nisin-producing lactic streptococci, it has been possible to increase slightly its thermoresistance without altering its ability to produce nisin.

The mortality curve at 60° C of the thermoresistant strain so obtained was in between the curves obtained with the original strain and with some naturally thermoresistant lactic acid bacteria (*Str. faecalis*, *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus*).

The determination of the « decimal reduction time » as a measure of thermoresistance is discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. McCLINTOCK, L. SERRES, J. J. MARZOLF, A. HIRSCH et G. MOCQUOT. Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporulés anaérobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Res.*, 1952, **19**, 187-193.
 - [2] Th. E. GALESLOOT, C. W. RAADSVELD et J. W. PETTE. Some preliminary experiments on the influence of nisin-producing starters upon the ripening of Edam cheese. *Netherl. Milk Dairy J.*, **11**, 1957, 152-163.
 - [3] L. I. KATZIN, L. A. SANDHOLZER et M. E. STRONG. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacterie to pasteurization. *J. Bact.*, 1943, **45**, 265-272.
 - [4] H. R. WHITE. The heat desinfection of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus lactis*. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, 1952, **15**, 8-14.
 - [5] T. RICHARDS et H. R. WHITE. The heat desinfection of *Streptococcus faecalis*. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, 1949, **2**, 61-65.
 - [6] A. HIRSCH, M. McCLINTOCK et G. MOCQUOT. Observations on the influence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyère cheese on the development of anaerobic spore-formers. *J. Dairy Res.*, 1952, **19**, 179-186.
 - [7] H. R. WHITE. The heat resistance of *Streptococcus faecalis*. *J. gen. Microbiol.*, 1953, **8**, 27-37.
 - [8] M. K. KRISHNA IYENGAR, H. LAXMINARAYANA et K. K. IYA. Studies on the heat resistance of some streptococci. *Indian J. Dairy Sci.*, 1957, **10**, 90-99.
 - [9] Y. ABD-EL-MALEK et T. GIBSON. Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.*, 1948, **15**, 233-248.
 - [10] M. BRIGGS. An improved medium for lactabacilli. *J. Dairy Res.*, 1953, **20**, 36-40.
 - [11] C. F. JR NIVEN, L. G. BUETTNER et J. B. EVANS. Thermal tolerance studies on the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Appl. Microbiol.*, 1954, **2**, 26-29.
 - [12] J. YUDKIN. Origin of aquired drug resistance in bacteria. *Nature*, 1953, **171**, 541-546.
-