1467
M

Teneur en diacétyle de levains et caillés maigres fabriqués à partir de bactéries lactiques concentrées, congelées, conservées sous azote liquide

par

LACRAMPE J.L.* et WEBER F.**

INTRODUCTION

L'intérêt manifesté par l'industrie laitière pour la conservation des cultures de levains, leur activité et leur pouvoir aromatisant n'a cessé de croître au cours des dernières années. Pour le consommateur, en effet, un des principaux critères de choix d'un produit laitier est son arôme. Ceci a conduit les chercheurs à étudier les micro-organismes producteurs et utilisateurs des divers composants de l'arôme de ces produits.

Les composants de l'arôme les plus abondants sont : le diacétyle, l'acétaldéhyde, l'éthanol et les acides organiques volatils.

Il a été reconnu que les plus importants sont l'acide lactique et le diacétyle ; le premier fournissant un goût agréable, le second étant à la base de l'arôme.

Par conséquent, outre les paramètres technologiques de diverses fabrications de caillés maigres par égouttage en moules et principalement par centrifugation, nous avons étudié plus particulièrement la production de diacétyle au niveau des levains et des caillés obtenus.

De nombreux travaux [4, 18, 21, 40, 56, 58] ont montré que les souches de *Leuconostoc citrovorum* et *Streptococcus diacetilactis* produisent des quantités importantes de diacétyle, alors que la plupart des souches de *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris* ne jouent un rôle que dans l'acidification du milieu et ne produisent que des quantités très faibles de ce corps.

Dans les produits laitiers, le diacétyle est formé par la fermentation des citrates du lait par les bactéries dites d'arôme : *Leuconostoc* et *Streptococcus diacetilactis*.

Sandine et al. [55] ont montré que les *Leuconostoc* ne fermentent le lactose qu'en très faible quantité.

* Université de Poitiers, Laboratoire de Biologie et Biochimie. I.U.T. de La Rochelle. B.P. 536.

** Ecole de Laiterie de Nancy (I.N.P.).

Andersen [1] fut le premier à utiliser un milieu contenant du citrate de sodium marqué et du lactose marqué et à émettre l'idée que ces deux corps pouvaient être à l'origine de la production de diacétyle par *Streptococcus diacetilactis*.

Les travaux de Harvey et Collins [25] réalisés en 1961 et de Seitz, Sandine et *al.* entrepris la même année montrèrent que les citrates sont métabolisés par les bactéries d'arôme et contribuent à la synthèse du diacétyle.

Galesloot [18] pense que le mécanisme de l'utilisation des citrates par les *Leuconostoc citrovorum* passe par la formation d' α -acétolactate. Les *Leuconostoc citrovorum* scindent les citrates en acétate et oxaloacétate et décarboxylent l'oxaloacétate en pyruvate.

Harvey et Collins [26] en 1963 émettent l'idée d'une conversion de l'excès de pyruvate en diacétyle, acétoïne et 2,3 butanediol. D'après eux la formation d'acétoïne et de diacétyle correspondrait à un processus de désintoxication tendant à abaisser le taux de pyruvate excédentaire.

Les travaux de Speckman et Collins [60] de 1968 montrent que l'acétaldéhyde pyrophosphate et l'acétyl-coenzyme A sont les précurseurs directs du diacétyle.

Les conclusions de la plupart des études concernant l'origine de la production de diacétyle sont que ce corps est formé à partir des citrates seuls ou de l'ensemble citrates-sucres fermentescibles [39, 44, 53] mais qu'en aucun cas il ne se forme uniquement à partir des sucres.

Si nous devons tenir compte des facteurs de production de diacétyle, nous devons également considérer les conditions de culture des bactéries utilisées ainsi que des différents paramètres qui tendront à diminuer cette production.

En effet, les souches que nous utilisons sont des souches mixtes et il est évident qu'au sein des levains obtenus, les proportions respectives des souches pures peuvent varier et modifier par là-même la texture et l'arôme du produit final. Il convient donc, en particulier, de déterminer avec rigueur les températures d'incubation et de stockage ainsi que les taux de levains à utiliser pour obtenir un produit de qualité constante.

Hammer et Babel [21] suggèrent l'emploi d'une température d'incubation de 21° C - 22° C pour maintenir un équilibre correct entre acidification et production d'arôme.

Il faut éviter en particulier les transferts de levains à 37° C, car à cette température les *Leuconostoc* sont fortement inhibés. Cette assertion est confirmée par les travaux de Pack, Vedamuthu et *al.* [48] qui montrent qu'à 30° C les taux de diacétyle produits par les levains sont inférieurs à ceux obtenus à 21° C.

Parmi les facteurs limitant la production de diacétyl, il faut signaler l'action de la diacétyl-réductase [2, 56].

L'existence d'une diacétyl-réductase et d'enzymes qui catalysent la réduction irréversible en acétoïne a été démontrée chez plusieurs espèces de micro-organismes par Seitz, Sandine et *al.* [56]. Cette étude a montré que les souches de *Streptococcus diacetylactis* sont très actives dans la réduction du diacétyl.

D'où l'intérêt de sélectionner des cultures peu aptes à réduire le diacétyl pour obtenir le maximum d'arôme dans les levains et les produits finis.

D'autre part, la réductase du diacétyl étant inhibée à basse température, il convient de refroidir très rapidement les cultures de levains tout en combinant cette opération avec le maximum de production de diacétyl.

Beaucoup de rapports signalent également que la production maximum de diacétyl par les espèces *Leuconostoc* cultivées dans le lait est atteinte lorsque le pH est voisin de 4,3 [12, 40, 42, 67]. De plus on trouve dans la littérature des articles mentionnant que la production de diacétyl est favorisée par une aération des levains [65] ; il y aurait oxydation de l'acide α -acétolactique en diacétyl par l'oxygène atmosphérique à 21° C.

De Man [13] note que l'oxydation de l'acide α -acétolactique en diacétyl peut être favorisée par le fait que ce composé est un réducteur puissant.

Dans notre étude, nous avons essayé de tenir compte de l'ensemble de ces résultats pour déterminer les données technologiques des fabrications de levains et de caillés maigres à l'aide de souches mixtes de bactéries lactiques concentrées, congelées, conservées sous azote liquide*.

En ce qui concerne le problème de l'analyse du diacétyl, nous avons cherché à appliquer une méthode de dosage qui soit en rapport avec les impératifs industriels, à savoir : commodité, précision, facilité d'exécution, prix de revient peu élevé.

De nombreux chercheurs se sont préoccupés de l'étude des composés de l'arôme des produits laitiers [4, 6, 7, 10, 16, 22, 24, 28, 38, 42, 44, 48, 57, 66] et en particulier de la production de diacétyl [3, 5, 8, 9, 13, 14, 15, 17, 29, 32, 34, 35, 36, 41, 44, 46, 56, 58, 61, 65, 66, 67].

Ces travaux ont eu pour but la sélection des souches de bactéries productrices d'arôme et l'étude de leur comportement en cultures mixtes associées à des micro-organismes acidifiants. Nous avons pensé qu'il serait souhaitable que les industriels puissent connaître les caractéristiques technologiques de leurs fabrications de façon com-

* Souches aimablement fournies par la firme Carlin-Marschall.

plète en déterminant régulièrement les teneurs en diacétyle de leurs levains et des produits qu'ils obtiennent à partir de ces levains puisqu'il est reconnu que ce composant de l'arôme est le plus important.

Des différentes méthodes d'analyse du diacétyle [30, 49, 50, 51, 52, 58, 62] nous avons retenu, en nous basant sur les critères énumérés ci-dessus, celle de Pack, Sandine et *al.* [48].

MATERIELS ET METHODES

1) Culture des ferments. Fabrication des levains

Les levains industriels ont été préparés dans tous les cas à partir de souches mixtes acidifiantes et aromatisantes constituées de *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Leuconostoc citrovorum* et *Streptococcus diacetylactis*.

Dans cette étude notre effort a porté principalement sur l'analyse de la production de diacétyle par les *Leuconostoc* et *Streptococcus diacetylactis*, ainsi que sur les variations de cette production en fonction :

- des taux d'ensemencement,
- de la température d'incubation des souches,
- de la température de conservation des levains,
- du pH.

A) FERMENTS UTILISÉS POUR LES FABRICATIONS « TÉMOINS »

Nos essais ont été réalisés en usines. Nous avons utilisé comme ferments de « référence » les ferments servant aux fabrications traditionnelles.

Ces souches mixtes ont été cultivées dans les conditions suivantes :

- substrat : lait écrémé stérilisé à 110° C pendant 15 mn,
- taux d'ensemencement : $1,5 \cdot 10^{-2}$ à $2 \cdot 10^{-2}$,
- température d'incubation : 22° C,
- temps d'incubation : 16 h à 19 h.

B) FERMENTS CONCENTRÉS CONGELÉS

Après décongélation rapide jusqu'à 20° C - 25° C, les ferments concentrés ont subi le traitement suivant :

- substrat : lait écrémé stérilisé à 110° C pendant 15 mn,
- taux d'ensemencement : $0,8 \cdot 10^{-4}$ à $3 \cdot 10^{-4}$,
- température d'incubation : 21° C à 25° C,
- temps d'incubation : 12 h à 16 h.

C) IDENTIFICATION ET DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES PRODUCTRICES DE DIACÉTYLE

Pour identifier et isoler les bactéries génératrices d'arôme, nous avons employé plusieurs milieux sélectifs [42, 47, 60] et en particulier celui de Mayeux, Sandine et *al.* [42]. Après dilution des ferments et des levains — telle que l'on ait 50 à 100 colonies par boîte — on ensemence le milieu puis on incube à 21° C pendant 4 j.

D) ACIDIFICATIONS DES LEVAINS

Des déterminations d'acidité Dornic et de pH en continu ont été réalisées au cours de la période d'incubation des levains provenant des souches commerciales « témoins » et des ferments concentrés.

Les variations de pH ont été enregistrées à l'aide d'un pH-mètre Chaix-Méca au 1/100 d'unité pH.

2) Fabrication des caillés « en continu »

Plusieurs séries d'essais de fabrication ont été réalisées en usines à l'aide des levains expérimentaux obtenus dans les conditions indiquées ci-dessus.

Les pâtes fraîches ont été comparées à celles provenant des levains traditionnels. Ces comparaisons ont porté sur les différents paramètres technologiques classiques, à savoir :

- extrait sec de la pâte,
- texture,
- qualités organoleptiques,
- teneur en azote total,
- teneur en calcium.

En outre, nous avons déterminé les teneurs en diacétyl au cours de la période de commercialisation des produits.

Ces essais ont été effectués à partir de laits de grand mélange. Après pasteurisation à 85° C, pendant 15 s, le lait écrémé a été refroidi à 27° C et stocké en tanks de 10 000 l.

Les fabrications se sont déroulées suivant les conditions et paramètres suivants :

A) MATURATION DES LAITS

- acidité initiale du lait : 16° D - 17° D,
- quantités de lait mises en œuvre : 8 000 l,
- acidité avant emprésurage : 17° D - 18° D,
- taux d'ensemencement en levains « concentrés » : 0,5 p. 100 à 0,8 p. 100,
- taux d'ensemencement en levains de « référence » : 0,5 p. 100 à 2 p. 100,

- température de maturation : 27° C,
- taux de présure : 10⁻⁵,
- acidité de début de séparation : 52° D à 56° D,
- Durée d'agitation : 45 mn à 60 mn.

B) SÉPARATION DES CAILLÉS

Séparateur Westfalia type S I H 10 007 :

- débit à l'entrée du séparateur : 3 600 à 4 000 l/h,
- acidité du sérum : 59° D à 63° D,
- température du caillé après refroidissement : 9° C - 10° C.

Du point de vue des conditions purement technologiques, la séparation des caillés expérimentaux n'a posé aucun problème sérieux en particulier en ce qui concerne le réglage du débit à l'entrée du séparateur.

3) Contrôles analytiques

Les analyses ont porté principalement sur le contrôle des levains et sur celui des caillés obtenus à partir des deux types de ferments.

Notre but a été :

- la détermination des paramètres technologiques d'utilisation des ferments concentrés congelés pour la fabrication de pâtes fraîches,
- le contrôle analytique de ces produits et surtout de leur teneur en diacétyl.

A) CONTRÔLES DE BASE

1) *Laits* :

- acidité Dornic : évolution au cours de la période d'incubation des souches et de maturation des laits de fabrication,
- pH idem,
- teneurs en matières azotées totales et solubles par la méthode micro-Kjeldahl,
- extrait sec total : par dessiccation à l'étuve à 102° C jusqu'à poids constant,
- teneur en calcium total par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2) *Sérums* :

Des échantillonnages ont été effectués au cours de la séparation des caillés (en début et en fin de centrifugation).

Les contrôles ont porté sur :

- l'acidité Dornic,
- le pH,
- les teneurs en extrait sec total,

- les teneurs en azote total et soluble,
- les teneurs en calcium.

3) *Caillés* :

- pH,
- extrait sec total,
- teneur en calcium total.

4) *Contrôles organoleptiques*.

B) DOSAGE DU DIACÉTYLE DANS LES LEVAINS ET LES CAILLÉS

Les dosages de diacétyl ont été effectués à diverses époques de la fabrication des levains ou de la conservation des caillés.

En ce qui concerne l'analyse des levains nous avons prélevé et analysé des échantillons à intervalles de temps égaux au cours de leur élaboration. Les résultats obtenus ont permis de montrer l'influence de la température d'incubation sur la production de diacétyl. Les caillés maigres obtenus ont été stockés dans leur emballage commercial en chambre froide à $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et dans une enceinte à $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Nous avons analysé ces caillés pendant toute la période de commercialisation, soit environ 18 j.

Pour la détermination des teneurs en diacétyl des levains et des caillés nous avons fait appel à la méthode colorimétrique d'Owades et Jakowac adaptée au lait par Pack, Sandine, Elliker, Day et Lindsay [48].

Cette méthode dérive de celle de Prill et Hammer [51]. Cependant il existe une différence fondamentale entre les deux procédés car dans celui de Pack et *al.* l'entraînement du diacétyl se fait par un courant d'azote et non par la vapeur d'eau. De plus l'appareillage utilisé permet l'installation d'une batterie de distillateurs. Cette batterie est alimentée par une bouteille d'azote dont le débit est réglé par un système de détente placé à la sortie de l'appareil.

Avant son admission dans l'appareillage, le gaz barbote à l'intérieur d'une bouteille à demi-remplie d'eau, ce qui permet de réaliser un premier réglage de débit. Une tubulure principale de répartition de l'azote permet d'alimenter une série d'unités de distillation associée à un nombre égal de tubes collecteurs de diacétyl (nous avons réalisé de 6 à 12 distillations simultanément).

Chaque unité de distillation - fixation de diacétyl se compose de :

- un tube à essais (de 250×25 mm) contenant l'échantillon à doser (20 g de levain ou 20 g de caillé dilués et homogénéisés dans 20 cm³ d'eau distillée),
- un tube de récupération contenant 1 ml d'hydroxylamine tamponnée et disposé de telle sorte que le conduit amenant le courant d'azote chargé de diacétyl parvienne à environ 1 mm du fond du tube (ce tube peut être un tube conique de centrifugation de 12 ml,

placé à l'intérieur d'un tube à essais identique à celui contenant l'échantillon à analyser).

Les deux tubes de 250×25 mm doivent être rodés et munis de bouchons eux-mêmes rodés solidaires de conduits destinés :

- à l'admission de l'azote barbotant dans le levain à doser,
- à la jonction avec le tube récupérateur de diacétyl,
- à l'évacuation de l'excès de gaz dans l'atmosphère à la sortie du 2^e tube.

Les tubes contenant les échantillons auxquels on ajoute quelques gouttes d'un produit antimousse*, sont placés dans un bain-marie à 65° C, les tubes contenant l'hydroxylamine tamponnée étant à la température ambiante. Après réglage du débit gazeux entre 100 et 150 ml/mm, la distillation se poursuit pendant 1 h 30 mn.

A la fin de la période de distillation, pour éviter les pertes au niveau des tubulures de jonction, on rince à l'aide de tampon phosphate et on récupère la solution de rinçage dans le tube conique contenant l'hydroxylamine.

On place alors les tubes coniques dans un bain-marie à 75° C pour réaliser la transformation de tout le diacétyl en diméthylglyoxine.

On ajoute alors 0,5 ml d'acétone phosphate pour fixer l'excès d'hydroxylamine. On poursuit la réalisation de la réaction colorée en ajoutant 1,5 ml de tartrate alcalin et 0,1 ml de sulfate ferreux. Après agitation, on ramène le volume à 5 ml à l'aide de la solution de phosphate tamponnée.

On procède 15 mn plus tard à la lecture de la densité optique à 530 m μ à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre Beckman DB).

Remarque : Des essais préliminaires ont montré que le taux de récupération du diacétyl est voisin de 96 p. 100. Nous en avons tenu compte dans l'expression des résultats.

RESULTATS

1) Fabrication et contrôle des levains

La première étape du travail a évidemment concerné la fabrication des levains, car pour obtenir des produits de bonne qualité, il faut en effet que les levains employés soient à leur optimum d'action tant au point de vue potentiel d'acidification, que production d'arôme.

* Antimousse 426 Rhodorsil - Rhône-Poulenc.

Dans cette optique, les paramètres les plus importants sont :

- le taux d'ensemencement du lait de départ,
- la température d'incubation.

Dans un premier temps, nous avons étudié les levains élaborés à partir des souches concentrées en les comparant à ceux préparés à l'aide de souches commerciales fréquemment utilisées dans l'industrie.

Cette comparaison a porté sur :

A) L'acidification des levains en fonction du temps d'incubation pour divers taux d'ensemencement.

B) L'influence du pH sur la production de diacétyl.

C) L'influence de la température d'incubation sur la production de diacétyl pour différents taux d'ensemencement en souches mixtes concentrées.

A) ACIDIFICATION DES LEVAINS

La définition d'un levain « type », préparé à partir des souches expérimentales, a posé un certain nombre de problèmes liés, comme nous l'avons déjà signalé, à la nature et à la composition de ces souches.

En effet, le but couramment recherché est l'obtention rapide d'un taux d'acidification suffisamment important pour atteindre des pH inférieurs à 5.

On peut parvenir à ce résultat de plusieurs façons :

- soit en utilisant des inoculums importants,
- soit en incubant les laits ensemencés à plus haute température.

Il a été montré qu'à des températures supérieures à 21° C, le diacétyl est détruit plus rapidement et que de plus, le taux maximum de production est inférieur.

Nous avons donc choisi d'incuber les levains à la température de 21° C et de faire varier le taux d'ensemencement des laits.

Après un certain nombre d'essais préliminaires basés sur la détermination des vitesses d'acidification et des teneurs en diacétyl, nous avons choisi d'étudier les produits obtenus pour des taux d'ensemencement égaux à : $0,8 \cdot 10^{-4}$, $1,4 \cdot 10^{-4}$, $2,10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$.

Il ressort de la comparaison des résultats obtenus à l'aide des levains expérimentaux et « classiques », que la vitesse d'acidification des premiers est dans tous les cas supérieure à celle des ferments de référence (fig. 1). L'acidité de 76° D est atteinte en 14 h pour un taux d'ensemencement de $1,4 \cdot 10^{-4}$, en 12 h 15 mn pour un taux de $2 \cdot 10^{-4}$ et en 11 h 45 mn pour $3 \cdot 10^{-4}$.

Dans les mêmes conditions de culture (à 21° C) il faut 16 h à la culture « témoin » pour s'acidifier de la même façon.

Notre objectif a été, dans une première phase des essais, de déterminer les taux d'ensemencements en souches concentrées tels que l'on puisse obtenir des levains comparables ou supérieurs au levain témoin au point de vue acidification et évolution du pH. Il est très important de déterminer des normes telles que l'industriel puisse diriger de façon rigoureuse, un cycle de fabrication. Il faut savoir à quel moment exact le levain doit être retiré de l'incubateur et quels sont les traitements qu'il convient de lui appliquer.

B) INFLUENCE DU pH SUR LA PRODUCTION DE DIACÉTYLE

L'évolution du pH nous l'avons vu, est particulièrement intéressante et importante à connaître car la production de diacétyle en dépend.

Deux pH nous ont paru déterminants en fonction du but à atteindre :

- a) pH 6,
- b) pH 4,30.

En effet, il a été montré que l'initiation de la synthèse du diacétyle n'a lieu que lorsque le pH est inférieur à 6 car la transformation des citrates ne se produit qu'au dessous de ce pH.

D'autre part, nous avons signalé que certains travaux ont abouti à la conclusion que le maximum de production de diacétyle correspond à un pH voisin de 4,30. On comprend donc que l'intérêt de l'industriel est de parvenir le plus rapidement possible à un tel pH.

L'examen des figures n° 1 et n° 2 montre que le taux d'ensemencement joue un grand rôle au point de vue vitesse d'acidification et baisse de pH.

Nous avons utilisé dans nos essais des volumes d'inoculum concentrés 200 fois, 100 fois, 70 fois et 50 fois plus faibles que pour l'élaboration du levain témoin.

Nous constatons que les temps enregistrés pour atteindre les pH mentionnés plus haut sont très différents d'un essai à l'autre. Pour un ensemencement initial en souche expérimentale au taux de 3.10^{-4} le pH est égal à 4,60 au bout de 14 h alors qu'il est de 4,90 dans le cas du « témoin » au bout du même laps de temps.

A 21° C les temps correspondant à pH 6 sont respectivement égaux à :

- 8 h 15 mn pour un ensemencement de 3.10^{-4} ,
- 8 h 45 mn pour un ensemencement de 2.10^{-4} ,
- 9 h pour un ensemencement de $1,4.10^{-4}$,
- 10 h 15 mn pour un ensemencement de $0,8.10^{-4}$,
- 9 h 45 mn pour la culture de référence.

fig. 1

Acidification des levains au cours de la période d'incubation à 21° C

Témoin	: —■—	Taux d'ensemencement : $1,5 \cdot 10^{-2}$
Expérimental	: —▲—	Taux d'ensemencement : $1,4 \cdot 10^{-4}$
Expérimental	: —□—	Taux d'ensemencement : $2 \cdot 10^{-4}$
Expérimental	: —△—	Taux d'ensemencement : $3 \cdot 10^{-4}$

fig. 2

Variations du pH des levains au cours de l'incubation à 21° C

Témoin	: —■—	Taux d'ensemencement : $1,5 \cdot 10^{-2}$
Expérimental	: —×—	Taux d'ensemencement : $0,8 \cdot 10^{-4}$
Expérimental	: —▲—	Taux d'ensemencement : $1,4 \cdot 10^{-4}$
Expérimental	: —●—	Taux d'ensemencement : $2 \cdot 10^{-4}$
Expérimental	: —△—	Taux d'ensemencement : $3 \cdot 10^{-4}$

Il est important de noter que pH 4,35 est obtenu 2 h à 2 h 30 mn plus tôt que pour le témoin lorsque le lait est ensemencé à l'aide de $2 \cdot 10^{-4}$ ou $3 \cdot 10^{-4}$ d'inoculum expérimental.

C) PRODUCTION DE DIACÉTYLE AU COURS DE L'INCUBATION

Outre la production d'acide lactique que nous venons de considérer, nous nous sommes intéressés particulièrement à celle de diacétyle dans les levains et les produits finis.

Notre but a donc été de concilier, dans la mesure du possible, les impératifs d'acidification du milieu et la production optimum de diacétyle.

Il se trouve que les deux phénomènes semblent liés et évoluer dans le même sens. Un paramètre important agit cependant sur ces deux productions : la température d'incubation des levains.

A la lumière des résultats précédents concernant l'acidification des levains et l'évolution du pH des divers essais, nous avons choisi de suivre la production de diacétyl au cours de la période d'incubation à différentes températures (21° C et 25° C) pour deux taux d'ensemencement en souches concentrées qui nous ont paru favorables, à savoir : $1,4 \cdot 10^{-4}$ et $3 \cdot 10^{-4}$.

Nous avons étudié la production du diacétyl en fonction du temps pour les levains dont nous venons de parler ainsi que pour le levain « témoin ». (Taux d'ensemencement : $1,5 \cdot 10^{-2}$).

Après ensemencement nous avons réparti le lait en flacons stériles de façon à pouvoir faire tous les dosages nécessaires sans contaminer le milieu au cours de la période d'incubation des levains.

TABLEAU 1

Variation de la teneur des levains en diacétyl (p.p.m.) au cours de l'incubation

Temps (h)	Taux d'ens.	$1,4 \cdot 10^{-4}$		Témoin $1,5 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	
		21° C	25° C	21° C	21° C	25° C
8 1/2		0,200	0,250	0,200	0,200	0,560
10		0,450	0,500	0,400	0,600	0,750
12		0,600	0,750	0,550	0,850	1,300
14		1,300	1,450	1,050	1,600	2,100
16		1,900	2,100	1,600	2,250	2,620
18		2,200	2,500	1,800	3,000	2,840
20		3,000	2,620	2,050	3,850	2,900
22		3,300	2,200	2,100	4,100	2,400
24		2,700	1,400	2,200	3,750	1,940
26		2,000	1,100	1,800	2,800	1,500
28		1,600	0,880	1,100	2,200	0,900
30		1,100	0,750	0,600	1,900	0,400
36		0,500	0,450	0,400	0,300	0,250

L'optimum de production semble être situé aux environs de 22 h à 24 h d'incubation.

L'ensemble des résultats mentionnés dans le tableau n° 1 montre que, quel que soit le taux d'ensemencement en souche expérimentale, l'initiation de la production de diacétyl a lieu plus tôt lorsque la température d'incubation des levains est de 25° C.

Pour ce qui est des teneurs maxima en diacétyl, nous constatons que ces valeurs sont atteintes plus rapidement à 25° C qu'à 21° C. Dans le cas d'un ensemencement initial de $1,4 \cdot 10^{-4}$, l'optimum de production a lieu au bout de 22 h à 21° C et de 20 h seulement à 25° C.

Pour un taux de $3 \cdot 10^{-4}$, le maximum se situe à 22 h approximativement pour une température d'incubation de 21° C et à 20 h pour 25° C.

Dans les deux cas on remarque que c'est à 21° C que l'on obtient les meilleurs résultats.

De plus, pour tous les essais de souches concentrées, les teneurs maximales en diacétyl sont nettement plus élevées que celles des ferments de référence.

TABLEAU 2

Teneur des levains expérimentaux en diacétyl (p.p.m.) en fonction du pH

pH	Taux d'ensemencement en ferments : $3 \cdot 10^{-4}$	
	21° C	25° C
5,4	0,850	0,680
5,2	1,000	0,700
5,0	1,140	0,720
4,9	1,220	0,750
4,8	1,300	1,000
4,6	2,240	1,480
4,5	2,760	2,500
4,4	3,840	2,840
4,35	4,100	2,900

Les résultats les plus probants ayant été obtenus pour une température d'incubation de 21° C et un taux d'ensemencement initial de 3.10^{-4} , nous avons dressé un tableau (tab. 2) des teneurs en diacétyle en fonction du pH pour les deux températures considérées.

Ce tableau nous montre qu'à 21° C comme à 25° C, le maximum de production correspond au pH de 4,35. Ceci semble indiquer que, bien que la synthèse du diacétyle soit plus rapide à 25° C qu'à 21° C et que l'on atteigne plus rapidement les pH inférieurs à 6 — pH de début de transformation des citrates — c'est à 21° C que le diacétyle est le plus stable ou s'accumule le plus.

2) Fabrication et contrôle des pâtes fraîches

A) BUTS POURSUIVIS

Les pâtes fraîches ont été fabriquées en usines par des procédés de séparation centrifuge et au niveau semi-industriel par égouttage en moules et en sacs. Dans toutes ces préparations la phase commune est la maturation des laits sous l'action des levains.

Notre but étant la comparaison de nos fabrications aux fabrications traditionnelles, nous n'avons modifié que quelques paramètres directement liés à la production d'arôme. Les facteurs qu'il ne nous a pas été possible de modifier ont été étudiés parallèlement au niveau du laboratoire.

Les résultats obtenus dans la culture des levains nous ont conduits à étudier leur influence sur l'arôme des caillés.

La fabrication des caillés maigres a posé les mêmes problèmes que celle des levains.

En outre, la qualité des pâtes fraîches est liée à la qualité des levains ; il faut donc stocker ces derniers dans des conditions de température et d'aération telles que le « potentiel » en diacétyle soit préservé.

Etant donné le rôle primordial du pH dans la production de l'arôme — rôle que nous avons montré dans les levains — le pH a servi de base au choix des autres données technologiques de fabrication des pâtes fraîches et en particulier des taux d'ensemencement des laits en levains.

Dans le but de déterminer le taux le plus favorable, nous avons enregistré les variations de pH des laits mis en œuvre au cours de la période de maturation. Cette étude a été menée en parallèle pour les essais témoins et expérimentaux.

Les facteurs les plus importants de la phase précédant la séparation des caillés par centrifugation ou égouttage, c'est-à-dire de la phase de maturation des laits, sont :

- 1) la qualité des ferments utilisés,

- 2) le taux d'ensemencement en levains,
- 3) la température de maturation des laits.

L'influence du 3^e facteur sur la qualité de l'arôme ayant été montrée lors des élaborations de levains, pour ne pas bouleverser les habitudes et le rythme des fabrications industrielles, nous avons fixé la température de maturation des laits employés pour les différents essais à 27° C. Au contraire, les deux premiers facteurs ont été modifiés au cours des essais et nous pouvons schématiquement diviser nos fabrications en deux groupes :

- I. — Taux d'ensemencement en levains identiques pour tous les essais.
- II. — Modification des levains employés par augmentation de l'ensemencement en souches de départ.
 - Augmentation des taux d'ensemencement en levains des laits de fabrication.

TABLEAU 3

Variation du pH pendant la période de maturation des laits de fabrication

- Levains expérimentaux : ensemencement souche mixte $1,4 \cdot 10^{-4}$
- Levains de référence : ensemencement souche mixte $1,5 \cdot 10^{-2}$

Temps (h)	Fabrication expérimentale (levains : 0,8 p. 100)	Fabrication « témoin » (levains : 0,55 p. 100)
1	6,54	6,60
3	6,52	6,58
5	6,49	6,54
7	6,00	6,23
9	5,42	5,59
11	4,79	4,98
13	4,54	4,68
15	4,43	4,55
17	4,37	4,43
19	4,34	4,38
21	4,25	4,35

Les dosages de diacétyl dans les levains au cours de la période d'incubation, tant à 21° C qu'à 25° C, ont montré que c'est toujours à pH 4,35 que la production d'arôme est la plus importante. Par conséquent, nous avons choisi ce pH comme pH de début de décaillage. Le tableau n° 3, qui concerne la variation des pH des laits en cours de maturation à 27° C, montre que dans ce cas cette opération peut être réalisée avec 2 h d'avance pour la fabrication expérimentale considérée.

D'une façon générale, les fabrications de pâtes fraîches par centrifugation ou égouttage ont été contrôlées, depuis le décaillage jusqu'au conditionnement, au niveau des sérums et des caillés, tant en ce qui concerne les données technologiques classiques (acidité, extrait sec) que les teneurs en azote et calcium.

Mis à part les paramètres que nous avons énumérés ci-dessus, la technologie des fabrications a été la même pour les essais de levains provenant des souches testées que pour les essais traditionnels.

Les résultats concernant les caractères que nous venons d'énoncer n'ont révélé aucune différence significative entre les produits expérimentaux et « classiques ».

Par contre, dans tous les cas, les caillés provenant de souches concentrées ont été trouvés plus aromatiques que les caillés de « référence ». C'est donc cette propriété que nous avons plus particulièrement étudiée.

B) RÉSULTATS CONCERNANT LA PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS

Conditions de fabrication :

- 1) taux d'ensemencement des levains en souche témoin : $1,5 \cdot 10^{-3}$,
- 2) taux d'ensemencement des levains en souche concentrée : $1,4 \cdot 10^{-4}$,
- 3) taux d'ensemencement des laits en levain témoin : $0,55 \cdot 10^{-3}$,
- 4) taux d'ensemencement des laits en levain expérimental : $0,55 \cdot 10^{-2}$.

Dès leur sortie du séparateur Westfalia, les caillés ont été stockés en chambre froide à + 5° C. Pendant toute la période de commercialisation (soit 18 j environ), nous avons effectué des dosages du diacétyl présent dans ces pâtes.

Le résultat le plus frappant à la lecture du tableau n° 4 qui résume ces analyses, est que leur teneur en diacétyl est beaucoup plus faible que celle des levains utilisés (moins de 1 p.p.m.). Ceci est évidemment dû au fait qu'une partie importante de l'arôme est éliminé avec les sérums lors de la séparation. Cependant, il convient de noter que la teneur initiale est plus élevée dans le caillé expérimental.

TABLEAU 4

Teneur en diacétyl (p.p.m.) des caillés au cours de la période de commercialisation
températures de stockage : + 5° C, + 18° C

Temps (h)	Caillé de référence taux d'ensemencement : 0,55 p. 100		Caillé expérimental taux d'ensemencement : 0,55 p. 100	
	5° C	18° C	5° C	18° C
6	0,700		0,900	
54	0,820		1,060	
126	1,160		1,126	
174	1,560	1,100	2,160	1,620
282	1,660	0,960	2,500	1,680
336	0,800	0,700	2,165	1,300
378	0,520	0,400	1,740	0,800
450	0,420	0,300	1,700	0,500

Les analyses successives ont confirmé ce premier résultat en traduisant en outre une augmentation du taux de diacétyl jusqu'au 12^e j de conservation à + 5° C, ainsi qu'une diminution constante au delà de cette date (tab. 4).

Après 5 j de stockage à + 5° C, dans le but d'étudier l'effet d'un réchauffement des caillés en cours de commercialisation sur leur teneur en diacétyl, nous avons placé une partie de ceux-ci dans une enceinte maintenue à + 18° C. Il a alors été constaté que la teneur en diacétyl décroît rapidement pour devenir pratiquement nulle le 20^e j.

C) RÉSULTATS CONCERNANT LA DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Conditions de fabrication :

- 1) taux d'ensemencement des levains en souche témoin : $1,5 \cdot 10^{-2}$,
- 2) taux d'ensemencement des levains en souche concentrée : $3 \cdot 10^{-4}$,
- 3) taux d'ensemencement des laits en levain témoin : $2 \cdot 10^{-2}$,

- 4) taux d'ensemencement des laits en levain expérimental : $0,80 \cdot 10^{-2}$.

La lecture du tableau n° 5 montre des écarts sensibles par rapport aux expériences précédentes. Si cette fois encore l'optimum de production de diacétyl se situe vers le 12^e j de stockage, on constate que dans les deux cas les teneurs les plus élevées sont supérieures à celles précédemment enregistrées.

Le stockage à + 18° C, après 5 j en chambre froide à + 5° C, produit les mêmes effets que lors des expériences précédentes. En outre, il faut noter que 20 j après la fabrication, les teneurs « résiduelles » en diacétyl sont supérieures pour les deux types d'essais aux valeurs trouvées dans la première série de fabrications.

La conjugaison de l'influence des deux paramètres modifiés — taux d'ensemencement des levains en souches concentrées et des laits de fabrication en levains expérimentaux — a donc un effet très bénéfique sur la teneur des pâtes en diacétyl.

TABLEAU 5

Teneur en diacétyl (p.p.m.) des caillés au cours de la période de commercialisation
température de stockage : + 5° C, + 18° C

Temps (h)	Caillé de référence taux d'ensemencement : 2 p. 100		Caillé expérimental taux d'ensemencement : 0,8 p. 100	
	5° C	18° C	5° C	18° C
6	0,420		0,950	
54	0,540		1,400	
78	0,800		2,000	
126	1,420		2,200	
198	2,560	1,900	2,950	2,600
246	2,640	1,800	3,160	2,700
294	2,540	1,600	3,400	2,800
342	2,000	1,400	2,800	2,500
390	1,340	0,900	2,000	1,640
450	1,200	0,850	1,800	1,735

DISCUSSION

1) Analyse des résultats

L'ensemble des résultats obtenus traduit pour tous les essais l'importance primordiale des deux facteurs conditionnant la production du diacétyle et qui sont :

- le pH,
- la température.

A) INFLUENCE DU pH

Nous avons constaté, en analysant les levains et les caillés maigres fabriqués à partir de ceux-ci, qu'il existe une relation directe entre la teneur en diacétyle du milieu et le pH (tab. 2).

Ceci n'est pas surprenant puisqu'il a été montré que la synthèse du diacétyle dans les produits laitiers ne se produit que lorsque le pH est inférieur à 6 car la transformation des citrates n'a lieu qu'à partir de cette valeur. Galesloot [18] signale qu'à des pH voisins de 5, la fermentation des sucres diminue. Il semble que lorsque la production de diacétyle commence la réserve de pyruvate soit alimentée principalement par la fermentation des citrates.

Ce même chercheur a émis l'idée que lorsque les *Leuconostoc* ne peuvent compléter leur processus métabolique, du fait de leur petit nombre ou d'un pH bas, le diacétyle tend à s'accumuler.

Notre étude montre également que l'optimum de production de diacétyle est atteint quand le pH est voisin de 4,30 ce qui est en accord avec les résultats de certains travaux : Cox [12], Michaelian et Hammer [44], Mather et Babel [41], Wiley et al. [67].

B) INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Le deuxième facteur important dans le processus de synthèse du diacétyle est la température.

Elle joue un rôle primordial aussi bien en ce qui concerne la préparation des levains que la maturation des laits de fabrication ou le stockage des produits obtenus.

Dans le cas de la préparation des levains nous avons vu qu'à 25° C (tab. 1), la synthèse du diacétyle s'initie plus tôt que pour des levains incubés à 21° C.

Ce phénomène peut sans aucun doute s'expliquer par un développement accéléré des bactéries acidifiantes — *Streptococcus lactis* en particulier — qui contribuent à abaisser le pH et par là-même à déclencher la transformation des citrates.

Or, parallèlement à cette précocité dans la production d'arôme, on constate que les maxima sont inférieurs et que les chutes des

teneurs en diacétyle sont plus rapides. Il y a donc là un antagonisme entre production et destruction du diacétyle.

Si on admet l'interprétation de la synthèse du diacétyle chez les *Leuconostoc* de Speckman et Collins [61], on peut penser que le milieu s'appauvrit plus rapidement dans ce cas en composés pré-curseurs du diacétyle ; c'est-à-dire en acétaldéhyde-TPP* et acétyl-coenzyme A.

Il est vraisemblable qu'à 25° C la diacétyle-réductase agit plus efficacement qu'à 21° C. Nous pouvons donc interpréter les résultats obtenus dans le cas des levains (tab. 1) comme la succession de deux phases :

- une phase ascendante au cours de laquelle la synthèse du diacétyle prévaut sur sa destruction par l'enzyme,
- une phase de déclin pendant laquelle il y a appauvrissement du milieu en diacétyle.

A la température de 21° C, ce phénomène est plus net du fait de l'accumulation plus importante de diacétyle. On atteint un optimum correspondant au pic de la courbe, puis la réduction prenant le pas sur la synthèse, on enregistre une chute brutale des teneurs en diacétyle.

— Interprétation de la première phase

Pour essayer de donner une explication aussi complète que possible de ces résultats, il faut rappeler les propriétés de certaines bactéries composant les souches mixtes que nous avons utilisées à savoir : *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* et *Leuconostoc citrovorum*.

Les souches de *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris* produisent des quantités assez considérables d'acétaldéhyde. Harvey [24] mentionne la production de 4,5 p.p.m. d'acétaldéhyde par *Streptococcus lactis* et de 9 p.p.m. par *Streptococcus cremoris* cultivés dans du lait.

D'autre part, les travaux de Lindsay et al. [38] ont montré que les *Leuconostoc* cultivés en présence de *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris* sont stimulés dans leur croissance par la production d'acétaldéhyde des streptocoques lactiques. Cet accroissement de population est notable jusque vers la 25^e h d'incubation. Les mêmes auteurs ont enregistré parallèlement une augmentation de la teneur en diacétyle des levains.

Il semble donc que nos résultats peuvent s'interpréter dans leur première phase comme une stimulation de la croissance des *Leuconostoc* par la production d'acétaldéhyde due aux streptocoques lactiques.

* TPP Thiamine Pyrophosphate (Aneurine ou vitamine BI-Pyrophosphate).

Ceci explique l'augmentation des teneurs en diacétyle au cours des 22 premières heures. Cette augmentation étant, nous l'avons vu, particulièrement notable pour des pH inférieurs à 5, pH correspondant à l'utilisation maximum des citrates par les *Leuconostoc*.

De plus, il se peut, comme certains travaux l'ont montré (Van Beynum-Pette [65], Taufel-Behnke [63] que l'acide α -acétolactique, agent réducteur puissant, soit oxydé en diacétyle par l'oxygène de l'air lors de la période de fermentation maximum de l'acide citrique.

Cependant, cette action est limitée à cette seule période. Il a également été montré que l'acétylméthylcarbinol n'est pas oxydé en diacétyle dans les mêmes conditions.

Dans le cas des caillés nous constatons aussi (tab. 4 et 5) une augmentation de la teneur en diacétyle au cours de la période de stockage à 5° C. Cette augmentation étant probablement due à une transformation beaucoup plus importante à cette température des précurseurs du diacétyle et en particulier de l'acide α -acétolactique.

Signalons enfin que certains contaminants comme les levures (*Saccharomyces cerevisiae* en particulier) peuvent contribuer à augmenter le taux de diacétyle.

— Interprétation de la deuxième phase

La constatation commune à cet ensemble d'essais est qu'une chute des teneurs en diacétyle se produit dans tous les cas à partir d'un certain temps d'incubation des levains ou de conservation des caillés.

Ce fait est à notre avis le résultat de deux phénomènes se produisant simultanément :

- l'épuisement du milieu en composés précurseurs du diacétyle,
- l'action de la diacétyle-réductase.

Le passage de la première phase à la phase de déclin correspond à un déséquilibre entre synthèse et destruction du diacétyle. Les deux réactions qui avaient lieu en même temps dans la première phase, avec pour résultat un excédent de diacétyle, se poursuivent au bénéfice de la réaction de destruction — vraisemblablement en acétoïne — du diacétyle.

A la température de 25° C ce passage se fait plus tôt pour les levains qu'à 21° C.

On observe les mêmes variations dans les caillés au delà de 10 à 12 j de conservation.

En ce qui concerne la réduction enzymatique du diacétyle, il faut tout d'abord noter que cette propriété est commune à de nombreuses bactéries.

Outre les bactéries lactiques utilisées dans cette étude, les germes psychrophiles et coliformes pouvant contaminer les produits laitiers sont actifs à ce point de vue (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*...).

Il suffit donc d'une contamination des levains par *Enterobacter aerogenes* par exemple, pour que le taux de diacétyle soit réduit à néant et que l'on obtienne des produits sans saveur.

Les tableaux 4 et 5 montrent que des caillés placés en cours de période de commercialisation à une température de 18° C, accusent des baisses notables de teneurs en diacétyle par rapport à ceux stockés à 5° C.

On peut donc penser que réciproquement il est possible de stopper les pertes en arôme en refroidissant brusquement les caillés. Ceci pouvant s'interpréter comme un arrêt de l'action de la diacétyl-réductase à basse température.

Il est évident que la connaissance des facteurs contribuant à la diminution de la teneur en diacétyle est très importante pour pouvoir assurer un arôme correct aux levains et aux caillés.

2) Méthode préconisée

L'ensemble de ces constatations nous amène à préconiser le processus suivant pour la culture des levains de souches concentrées :

1) Réchauffement rapide des cultures congelées et maintien dans un bain-marie à 20° C.

2) Taux d'ensemencement du lait : $3 \cdot 10^{-4}$.

3) *Culture en quatre phases :*

a) Incubation du levain à 25° C pendant 10 à 12 h de façon à provoquer une acidification rapide et importante.

Cette évolution pourrait être suivie à l'aide d'un pHmètre enregistreur par exemple et stoppée lorsque le pH serait égal à 5.

b) Ralentissement de la production d'acide lactique par refroidissement brusque sous agitation jusqu'à la température de 21° C.

Remarque : Un refroidissement prématuré ne donnerait pas de bons résultats car il y aurait dans ces conditions un retard dans l'acidification du milieu et la réaction enzymatique d'utilisation des citrates sous l'action de la citrate perméase ne pourrait se produire. En conséquence, il n'y aurait pas dans le milieu suffisamment d'acétaldéhyde-TPP et d'acétyl-CoA qui sont les précurseurs directs du diacétyle.

c) Incubation à 21° C jusqu'au pH optimum de synthèse, soit 4,35.

d) Refroidissement vigoureux sous agitation jusqu'à 2° C à 4° C dans le cas où les levains ne sont pas utilisés immédiatement.

Pour ce qui est de la fabrication des caillés, il est évident que la richesse en diacétyle des produits obtenus dépend des levains employés et les résultats que nous avons enregistrés montrent que la pro-

duction est d'autant plus considérable que le levain utilisé est lui-même plus aromatique.

On peut remarquer qu'il paraît possible d'augmenter la teneur en diacétyl des levains en ensemençant les laits à l'aide d'inoculum plus importants.

Quelques essais ont été réalisés au niveau du laboratoire et ont permis de constater que si on obtient un gain d'acidification, le taux de diacétyl des levains ne subit pas d'augmentation vraiment intéressante. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le milieu est plus rapidement épuisé en composés précurseurs du diacétyl.

D'autre part, il n'est pas rentable pour l'industriel d'employer de trop grandes quantités de souches concentrées.

Pour les raisons développées plus haut, il faut également surveiller la maturation des laits de fabrication de la même façon que les levains au cours de la période d'incubation. Dans ce cas là également, on peut suivre l'évolution du milieu et diriger son « aromatisation » en procédant comme précédemment par étapes. Comme pour les levains, on peut enregistrer les variations de pH et se fixer un pH de décaillage — par exemple 4,40 — compte tenu du fait que la pâte ne sera refroidie que 15 mn environ après cette opération et que par conséquent on aura une légère baisse de pH.

Enfin, nous avons montré toute l'importance des conditions thermiques de conservation des caillés obtenus. Pour assurer un développement appréciable de l'arôme des produits, il est nécessaire de les refroidir jusqu'à des températures de l'ordre de 3° C à 5° C. Il faut en outre éviter en cours de commercialisation de réchauffer les caillés, ce qui a pour effet de provoquer une chute importante du taux de diacétyl en favorisant l'action de la diacétyl-réductase.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus à l'aide des souches concentrées congelées nous paraît très positif tant du point de vue purement technologique que de l'amélioration des qualités aromatiques des produits obtenus.

Comme nous l'avons souligné, la méthode de culture des levains préconisée, contrôlée par des évaluations systématiques des teneurs en diacétyl, doit permettre de parvenir à l'obtention de produits de meilleure qualité.

Bien que la technique analytique utilisée ne soit pas exempte de difficultés et que les valeurs trouvées puissent être entachées de légères erreurs dues à la possibilité d'interférence dans le dosage de certains composés carbonylés, tel que l'acide α -acétolactique, nous

pensons qu'en prenant toutes les précautions nécessaires, on peut parvenir à des résultats significatifs et comparables entre eux.

En outre, ce type de dosage est très facilement réalisable dans la plupart des usines car il fait appel à des appareils simples et peu onéreux.

A noter que l'emploi de souches concentrées nécessite leur maintien à très basse température de la production à l'utilisation et que le respect de la chaîne du froid pose des problèmes pratiques. Pour être parfaite, une conservation de très longue durée doit être faite à température voisine de celle de l'azote liquide (-196°C). Néanmoins, une température de conservation inférieure ou égale à -35°C permet de maintenir un taux de survie élevé pendant plusieurs mois. Dans ces dernières conditions, il est cependant important d'éviter des relèvements de température, même de courte durée, de plus de 10°C . Ceux-ci entraînent des modifications cristallines préjudiciables à la survie des micro-organismes.

Le système de culture est en lui-même très intéressant car il supprime les problèmes de repiquage des souches toujours délicats pour les bactéries lactiques et limite notamment les risques de contamination. De plus, l'apport d'un nombre très élevé de germes acidifiants et aromatisants permet d'accélérer les fabrications tant au niveau des levains que des caillés en améliorant leurs qualités organoleptiques.

Résumé

La fabrication de levains et de caillés maigres à l'aide de souches mixtes de bactéries acidifiantes et aromatisantes concentrées congelées conduit à l'obtention de produits d'excellente qualité qui, grâce à un apport massif de *Leuconostoc citrovorum*, ont une teneur en diacétyl supérieure à celle des fabrications traditionnelles.

La température optimum de culture de ces levains semble être voisine de 21°C . Des températures d'incubation plus élevées provoquent une destruction plus rapide du diacétyl.

En ce qui concerne les caillés, l'expérience montre que les conditions thermiques de stockage jouent un grand rôle. Après conditionnement, les produits doivent être rapidement placés en chambre froide à $4^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$.

Summary

The manufacture of lactic starters and non fat lactic curds from frozen concentrated mixed cultures composed of acidifying and aromatizing bacteria, leads to obtaining first quality products which, thanks to massive addition of *Leuconostoc citrovorum*, have a diacetyl level well above the traditional products content.

The optimum culture temperature for growing these lactic starters seems to be near 21° C. Higher incubation temperatures cause faster destruction of diacetyl.

As far as lactic curds are concerned, experiences have shown that storage heat conditions play an important part. After packaging, products must be put in a cold room at 4° C to 5° C without delay.

Resumen

El uso de sepas acidificantes y aromatizantes concentradas congeladas en fabricaciones de fermentos y de quesos frescos permite - mediante gran numero de bacterias productoras de diacetilo - obtener productos de aroma superior al de las elaboraciones tradicionales.

La temperatura óptima de incubacion de aquellas sepas parece ser vecina de 21° C. Temperaturas mas altas deben ser rechazadas por conducir a una destrucción mucho mas rapida del diacetilo.

En lo que se refiere a las cuajadas, los resultados demuestran la gran importancia de las condiciones térmicas de almacenamiento. Después de su envasado los productos deben ser refrigerados rapidamente hasta 4° C - 5° C.

Reçu pour publication le 7 juin 1973.

Bibliographie

- [1] ANDERSEN (V.B. (1959). — Formation of diacetyl and acetoin by certain starter organisms. *Milchwissenschaft*, 14, 429-432.
- [2] AURERT (J.P.) and MILLET (J.) (1953). — Degradation of diacetyl by a bacterial enzymatic extract. *Comptes rendus, Académie des Sciences, Paris*, 236, 1512.
- [3] BARNICOAT (C.R.) (1935). — La détermination du diacétyle et de l'acétyl-méthylcarbinol. *Analyst.*, 60, 653-662.
- [4] BASETTE (R.), BAWDON (R.E.) and CLAYDON (T.J.) (1967). — Production of volatile materials in milk by some species of bacteria. *J. Dairy Sci.*, 50, 167.
- [5] BENNETT (G.), LISKA (B.J.) and HEMPENIUS (W.L.) (1965). — Effect of other flavor components on the perception of diacetyl in fermented dairy products. *J. Food Sci.*, 30, 35.
- [6] BUSSE (M.) and KANDLER (O.) (1961). — Biosynthesis of acetoin by *Leuconostoc citrovorum*. *Nature*, 189, 774-775.
- [7] BUSSE (R.L.) and WESTERFELD (W.W.) (1944). — The mechanism of ketol formation from pyruvate and aldehydes. *J. Biol. Chem.*, 152, 113-118.
- [8] CHRISTENSEN (M.D.) and PEDERSON (C.S.) (1958). — Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.*, 6, 319.
- [9] COLLINS (E.B.), JENNINGS (W.G.) and ANDERSON (V.B.) (1959-1961). — Formation of diacetyl and acetoin by certain starter organisms. *Milchwissenschaft*, 14, 429 - 16, 151.

- [10] COPPENS (R.) (1954). — Quelques observations sur la biochimie des ferments d'arôme. *Netherlands Milk Dairy P.*, 8, 14.
- [11] COWMAN (R. A.) and SPECK (M. L.) (1965). — Ultralow temperature storage of lactic *streptococci*. *J. Dairy Sci.*, 48, 1531-1532.
- [12] COX (G. A.) (1945). — The effect of acidity on the production of diacetyl by *betacocci* in milk. *J. Dairy Res.*, 14, 28-35.
- [13] DE MAN (J. C.) (1959). — The formation of diacetyl and acetoin from α -acétolactic acid. *Rec. Trav. Chim.*, 78, 480-486.
- [14] DE MAN (J. C.) and PETTE (J. W.) (1956). — The mechanism of diacetyl formation in butter starters. *14th Intern. Dairy Congr.*, 2, 89-103.
- [15] EVENHUIS (N.) (1952). — Diacetyl formation in starters. *Netherlands Milk Dairy J.*, 6, 137 - 6, 331.
- [16] EVENHUIS (N.) (1954). — Quelques remarques sur la biochimie des ferments d'arôme. *Netherlands Milk Dairy J.*, 8, 19.
- [17] FEDEROV (M. V.) and KRUGLOVA (L. A.) (1955). — Formation of acetylmethylcarbinol and diacetyl in cultures of lactic acid bacteria. *Dokl. Akad. Nauk. USSR*, 103, 161-164.
- [18] GALESLOOT (Th. E.) (1962). — The bacteriology and biochemistry of starters and ripened cream. *Proc. 16th Intern. Dairy Congr.*, vol. D, p. 143.
- [19] GALESLOOT (Th. E.) and HASSING (F.) (1961). — Some differences in behaviour between starters containing as aroma bacterium either *Streptococcus diacetilactis* or *Betacoccus cremoris*. *Netherlands Milk Dairy J.*, 15, 225.
- [20] GIBSON (C. A.), LANDERKIN (G. B.) and MORSE (P. M.) (1965). — Survival of strains of lactic *streptococci* during frozen storage. *J. Dairy Res.*, 32, 151-156.
- [21] HAMMER (B. W.) and BABEL (F. J.) (1943). — Bacteriology of butter cultures. *A review J. Dairy Sci.*, 26, 83.
- [22] HAPPOLD (F. C.) and SPENCER (C. P.) (1952). — The bacterial formation of acetylmethylcarbinol and 2,3 butylene glycol. *Biochim. Biophys. Act.*, 8, 18-29.
- [23] HARVEY (R. J.) (1960). — Production of acetone and acetaldehyde by lactic *Streptococci*. *J. Dairy Research*, 27, 41.
- [24] HARVEY (R. J.) and COLLINS (E. B.) (1962). — Citrate transport system of *Streptococcus diacetilactis*. *J. Bacteriol.*, 83, 105.
- [25] HARVEY (R. J.) and COLLINS (E. B.) (1961). — Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.*, 82, 954-959.
- [26] HARVEY (R. J.) and COLLINS (E. B.) (1963). — Role of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetilactis*. *J. Bacteriol.*, 86, 1301-1307.
- [27] HEINEMANN (B.) (1958). — Preserving the activity of lactic cultures. *J. Dairy Sci.*, 41, 705.
- [28] JUNI (E.) and HEYM (G. A.) (1956). — A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. *J. Bacteriol.*, 71, 425.
- [29] KOMAREK (K.) (1937). — Application de la diméthylglyoxime comme indicateur en volumétrie. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 9, 247-253.
- [30] KUNZE (R.) (1936). — Microdosage gravimétrique de l'acétoïne et du diacétyl. *Mikrochem. Molish Festschrift*, 279-289.
- [31] LAMPRECH (E. D.) and FOSTER (E. M.) (1963). — The survival of starter organisms in concentrated suspensions. *J. Appl. Bact.*, 26, 359-369.
- [32] LATIMER (R. A.), GLENISTER (P. R.), KOEPPLE (K. G.) and DALLOS (F. C.) (1969). — A review of the diacetyl problem. *Tech. Quat. Master Brew. Ass. Amer.*, 6, 24-29.

- [33] LATTEY (1968). — Studies on ultra deep frozen cheese starters. *N.Z.J. Dairy Technol.*, 3 (r), 35-41.
- [34] LEES (G.J.) and JAGO (G.R.) (1970). — The estimation of diacetyl in the presence of other carbonyl compounds. *J. Dairy Res.*, 37, 129.
- [35] LEWIS (M.J.) (1968). — Recent research on diacetyl. *Brew. Dig.*, 43, 75-81.
- [36] LINDA (F.), CHUANG and COLLINS (E.B.) (1968). — Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast. *J. Bacteriol.*, 95, 2083-2089.
- [37] LINDGREN (B.) and SWARTLING (P.) (1960). — Maintenance of active lactic cultures. (En suédois). *Dairy Sci. Abstr.*, 23, 379.
- [38] LINDSAY (R.C.), DAY (E.A.) and SANDINE (W.E.) (1965). — Green flavor defect lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 48, 863-869.
- [39] LINDSAY (R.C.), DAY (E.A.) and SATHER (L.A.) (1967). — Preparation and evaluation of butter culture flavor concentrates. *J. Dairy Sci.*, 50, 25.
- [40] MARTH (E.H.) (1962). — Symposium on lactic starter cultures. III. Certain aspects of starter culture metabolism. *J. Dairy Sci.*, 45, 1271.
- [41] MATHER (D.W.) and BABEL (F.J.) (1959). — A method for standardizing the diacetyl content of creamed cottage cheese. *J. Dairy Sci.*, 42, 1045-1056.
- [42] MAYEUX (J.V.), SANDINE (W.E.) and ELLIKER (P.R.) (1962). — A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strains starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, 655.
- [43] MICHAELIAN (M.B.), FARMER (R.S.) and HAMMER (B.W.) (1933). — The relationship of acetylmethylcarbinol and diacetyl to butter cultures *Iowa Agr. Expt. Sta. Res. Bull.*, n° 155, 323-360.
- [44] MICHAELIAN (M.B.) and HAMMER (B.W.) (1936). — The oxidation of acetylmethylcarbinol to diacetyl in butter cultures. *Iowa Agr. Expt. Sta. Res. Bull.*, 205.
- [45] MIZUNO (W.G.) and JEZESKI (J.J.) (1959). — Studies on starter metabolism. IV. Effects of various substrates on the formation of acetoin by a mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 42, 251-263.
- [46] MOHR (W.) et WELLM (J.) (1937). — Détermination du diacétyle en tant qu'arôme du beurre. Congrès de Berlin. *Molkereizeitung*, 2, 98-104.
- [47] NICKELS (V.E.) und LEESMENT (H.) (1964). — Methode zur Differenzierung und quantitativen Beshmung von Saureweckerbakterien. *Milchwissenschaft*, 19, 374.
- [48] PACK (M.Y.), SANDINE (W.E.), ELLIKER (P.R.), DAY (E.A.) and LINDSAY (R.C.) (1964). — Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed strain starters. *J. Dairy Sci.*, 47, 981.
- [49] PACK (M.Y.), VEDAMUTHU (E.R.), SANDINE (W.E.) and ELLIKER (P.R.) (1968). — Effect of temperature on growth and diacetyl production by aroma bacteria in single and mixed strain lactic cultures. *J. Dairy Sci.*, 51, 339.
- [50] PIEN (J.) BAISSSE (J.) et MARTIN (R.) (1937). — Le dosage du diacétyle dans les beurres. *Le Lait*, 17, 675-698.
- [51] PRILL (E.A.) and HAMMER (B.W.) (1938). — A colorimetric method for the determination of diacetyl *Iowa State College J. Sci.*, 12, 385.
- [52] RUCHE (H.A.) et CORBETT (W.J.) (1937). — Méthode volumétrique pour la détermination du diacétyle. *J. Dairy Sci.*, 20, 456-457.
- [53] RUDNIK (A.W.) and GLENN (W.E.) (1960). — The use of frozen culture as a direct inoculum for making cottage cheese. *J. Dairy Sci.*, 43, 845.
- [54] RUSHING (N.B.) and SENN (V.J.) (1960). — Effect of citric acid concentration on the formation of diacetyl by certain lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.*, 8, 286-290.

- [55] SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and HAYS (H.) (1962). — Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic *Streptococcus* group. *Can. J. Microbiol.*, 8, 161-174.
- [56] SEITZ (E. W.), SANDINE (W. E.), DAY (E. A.) and ELLIKER (P. R.) (1961). — Studies on factors affecting diacetyl production by *Streptococcus diacetilactis*. *J. Dairy Sci.*, 44, 1159.
- [57] SEITZ (E. W.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and DAY (E. A.) (1963). — Distribution of diacetyl reductase among bacteria. *J. Dairy Sci.*, 46, 186-189.
- [58] SEITZ (E. W.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and DAY (E. A.) (1963). — Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptococcus diacetilactis*. *Canadian J. Microbiol.*, 9, 431-440.
- [59] SIEST (G.) et LANDRY (Y.) (1968). — Méthode colorimétrique simple et sensible de dosage du diacétyle par l'urée. *Bull. Soc. Pharma. Nancy*, 79, 22-30.
- [60] SKEAN (J. D.) et OVERCOAST (W. W.) (1962). — Milieu d'isolement de *Leuconostoc citrovorum* et *Streptococcus diacetilactis*, de *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 45, 1530.
- [61] SPECKMAN (R. A.) and COLLINS (E. B.) (1968). — Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.*, 95, 174-180.
- [62] SPECKMAN (R. A.) and COLLINS (E. B.) (1968). — Separation of diacetyl acetoin and 2-3 butylene glycol by salting out chromatography. *Anal. Biochem.*, 22, 154-160.
- [63] TAUFEL (K.) and BEHNKE (U.) (1960). — Investigations on the formation of acetoin and diacetyl by cream souring cultures. *Nahrung.*, 4, 197-208.
- [64] TESTONI (G.) et CINSIA (W.) (1931). — Dosage du diacétyle dans le beurre. *Ann. Chim. Applicata.*, 21, 147-150.
- [65] VAN BEYNUM (J.) and PETTE (J. W.) (1939). — The decomposition of citric acid by *Betacoccus cremoris*. *J. Dairy Res.*, 10, 250-266.
- [66] VAN NIEL (C. B.), KLUYVER (A. J.) und DERX (H. G.) (1929). — Uber das Butteraroma. *Biochem. Z.*, 210, 234-251.
- [67] WILEY (W. J.), COX (G. A.) and WHITEHEAD (H. B.) (1939). — The formation of diacetyl production by lactic streptococci. *Australian Council Sci. Ind. Res.*, 12, 239-249.
-