Les levains lactiques mésophiles. Une revue *

par

T. M. COGAN**

Depuis une époque immémoriale l'homme a mis à profit la fermentation pour conserver nombre de ses aliments. Au cours de la fermentation, il se produit normalement des modifications à la fois de la texture et de la flaveur du produit. Les bactéries sont généralement les agents de ces transformations encore que des levures et des moisissures soient aussi impliquées dans la préparation de certains aliments. La principale modification qui intervient est la production de grandes quantités d'acide à partir de sucres fermentescibles que contient la matière première. Le principal produit de la fermentation est de l'acide lactique, auquel peuvent s'ajouter dans certains cas de petites quantités d'acide propionique et d'acide acétique. D'autres produits mineurs du catabolisme des sucres, de même que des produits de dégradation des protéines et des matières grasses, contribuent aussi à la formation de la flaveur finale du produit. La plupart des bactéries lactiques — homofermentaires et hétérofermentaires, thermophiles et mésophiles, que ce soient des streptocoques, des lactobacilles, des leuconostocs ou des pédiocoques — sont impliquées dans la préparation de très nombreux aliments fermentés. Cette conférence est uniquement consacrée aux deux groupes de bactéries lactiques, streptocoques mésophiles et leuconostocs, présentes dans les levains lactiques mésophiles utilisés en technologie laitière. Se trouvent donc exclues les bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la préparation des yoghourts et pour la fabrication des fromages à pâte cuite et de certains fromages italiens. En outre, plutôt que de nous livrer à un examen exhaustif de la littérature — nous renvoyons le lecteur à la revue très complète de Lawrence *et al.* [37] — nous n'examinerons que les facteurs les plus importants eu égard à la préparation et au développement des levains.

---

* Conférence présentée au Congrès International de Microbiologie et d'Industrie Alimentaire, organisé par l'A.P.R.I.A., Hôtel Méridien, Paris, le jeudi 11 octobre 1979. Traduction effectuée par J. P. Accolas, I.N.R.A. - 78350 Jouy-en-Josas.

** The Agricultural Institute, Fermoy, Co. Cork (République d'Irlande).

HISTORIQUE

L'emploi des levains en vue d'amorcer la fermentation du lait ou de la crème, pour fabriquer du fromage ou du beurre, est une très ancienne pratique qui remonte à une époque où l'on ignorait tout des bactéries des levains ou, mieux dit, où l'on ne soupçonnait pas que les bactéries jouaient un rôle quelconque. Initialement, on abandonnait du lait ou de la crème à la température ambiante afin que la flore lactique adventice présente s'y développât jusqu'à provoquer la coagulation. Toutefois, ce procédé entraînait aussi la multiplication de bactéries indésirables et, en conséquence, la formation de flaveurs défectueuses. Ces méthodes hasardeuses ont été utilisées jusqu'à la fin du XIX^e siècle, c'est-à-dire l'époque où Storch [68] au Danemark et Conn [12] aux Etats-Unis ont montré qu'il était possible d'obtenir un beurre de bonne qualité, « exempt de défauts d'aigrissement », lorsqu'on utilisait des cultures pures de *Streptococcus lactis* pour sûrir la crème. Cependant, ce beurre ne possédait pas l'arôme caractéristique et fin des meilleurs beurres traditionnels et l'on en ignorait la raison jusqu'en 1919, date à laquelle trois groupes de chercheurs, Hammer et Bailey [21] aux Etats-Unis, Storch [69] au Danemark et, aux Pays-Bas, Boekhout et Ott de Vries [7], montrèrent indépendamment que les cultures de bactéries lactiques qui déterminaient un bon développement de l'arôme, contenaient en fait un mélange de deux types différents de bactéries lactiques, l'un étant responsable de la production d'acide lactique (*S. lactis* et *S. cremoris*) et l'autre de la production d'arôme. A cette époque, il fut montré que les leuconostocs étaient producteurs de l'arôme. En 1936, de nouvelles bactéries lactiques aromatiques furent isolées indépendamment par Matuszewski *et al.* [42] en Pologne qui les dénommèrent *S. diacetylactis* et par Van Beynum et Pette [5] aux Pays-Bas qui utilisèrent la dénomination *S. citrophilus*. Par la suite, il fut montré que ces streptocoques étaient similaires (Swartling [70]) et la dernière édition du Bergey's Manual [4] a retenu la dénomination *S. lactis* subsp. *diacetylactis*. La seule différence entre cette espèce et *S. lactis* résulte de sa propriété de fermenter le citrate pour donner divers produits terminaux de fermentation, parmi lesquels le diacétyle est certainement le plus important. Dans les publications européennes les plus anciennes, les leuconostocs étaient fréquemment dénommés bétacoques, alors qu'on utilisait les dénominations *S. citrovorum* et *S. paracitrovorus* dans les travaux américains datant de la même époque. Pour évoquer ces bactéries, on se réfère souvent aussi à des vocables tels que « bactéries aromatiques » ou « bactéries fermentant le citrate », vocables qui sont tout à fait justifiés comme nous le verrons ci-après.

COMPOSITION DES LEVAINS LACTIQUES

Trois types de levains lactiques sont utilisés, à savoir les levains mixtes («mixed strain»), les cultures pures («single strain») et les

levains multiples («multiple strain»). Les levains mixtes, qui sont communément utilisés en Europe et en Amérique du Nord, sont constitués par des mélanges, dont la composition exacte est souvent indéterminée, de plusieurs souches de *S. cremoris* (surtout) et de *S. lactis*, ne présentant pas de relations phagiques entre elles. Cela peut sembler quelque peu contradictoire d'affirmer à la fois connaître les relations phagiques entre les souches et ignorer les souches composantes de ces levains ! Quoi qu'il en soit, l'une de leurs caractéristiques les plus avantageuses est qu'ils sont plus résistants aux attaques de phages que les cultures pures, puisqu'ils contiennent plusieurs souches appartenant à des lysotypes différents ; toutefois, l'emploi de ces levains n'est pas sans présenter des inconvénients, le principal étant qu'une seule souche arrive fréquemment à dominer dans la culture, après des repiquages répétés. Cette dominance peut être liée à la production de bactériocine (Daly, communication personnelle). Dans un tel cas, l'attaque de la souche dominante par un phage se traduit par une défaillance du levain, incapable de produire de l'acide. Cependant dans de nombreuses régions du monde, les mêmes levains mixtes ont été utilisés de façon routinière, sans diminution notable de leur activité acidifiante. Cela peut s'expliquer par la présence de phages dans ces levains, comme nous le verrons plus loin.

De nombreux levains mixtes sont composés de deux types de bactéries, l'un étant responsable de la production d'acide et l'autre de la production d'arôme.

Les bactéries acidifiantes prédominantes sont généralement des souches de *S. cremoris*, parfois de *S. lactis*, tandis que les bactéries aromatiques sont des leuconostocs ou *S. lactis* subsp. *diacetyllactis*. Cette dernière espèce exerce une double fonction puisqu'elle produit aussi de grandes quantités d'acide. On subdivise les levains mixtes en quatre groupes selon la nature des bactéries d'arôme qu'ils contiennent :

— les levains du type B contiennent des leuconostocs producteurs d'arôme, tels que *Leuc. cremoris* (*Leuc. citrovorum*), *Leuc. dextranicum* et (ou) *Leuc. lactis* ;

— les levains du type D contiennent *S. lactis* subsp. *diacetyllactis* comme producteur d'arôme ;

— les levains du type BD contiennent à la fois des leuconostocs et *S. lactis* subsp. *diacetyllactis* comme producteurs d'arôme ;

— les levains du type N ou O ne contiennent pas de bactéries aromatiques.

La dénomination « B » est issue de la première lettre du nom attribué autrefois au genre *Leuconostoc*, à savoir *Betacoccus* (Orla-Jensen). En toute logique, les levains des types B et BD devraient donc être maintenant dénommés les premiers, levains du type L et les seconds, levains du type LD ou du type DL. Les principales caractéristiques qui permettent de différencier les espèces bactériennes des

TABLEAU 1

Principaux caractères distinctifs des espèces bactériennes présentes dans les levains lactiques mésophiles

Espèce	Mode de fermentation des sucres	Configuration de l'acide lactique formé	Action sur le lait tournesolé	Fermentation du citrate	Production d'acétoïne à partir du citrate	NH ₃ formé à partir de l'arginine	Croissance à 40° C
<i>Leuc. cremoris</i>	hétéro-	D (—)	Ia	+	—	—	— ^c
<i>Leuc. dextranicum</i>	hétéro-	D (—)	Ia	±	—	—	— ^c
<i>Leuc. lactis</i>	hétéro-	D (—)	A ± C	+	—	—	— ^c
<i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	homo-	L (+)	RAC	+	+	+ ^b	±
<i>S. lactis</i>	homo-	L (+)	RAC	—	—	+	+
<i>S. cremoris</i>	homo-	L (+)	RAC	—	—	—	—

*I = pas de changement ; R = réduction ; A = acidification ; C = coagulation.

a : dans le lait tournesolé additionné de 0,3 p. 100 d'extrait de levure, la plupart des souches produisent de l'acide et réduisent le tournesol. Toutes les souches produisent de l'acide dans du lait tournesolé additionné de 0,3 p. 100 d'extrait de levure et de 0,5 p. 100 de glucose.

b : quelques souches ne désaminent pas l'arginine.

c : 39° C.

levains lactiques mésophiles sont présentées dans le tableau 1 (Garvie [19] ; Sandine *et al.* [63]).

L'identification des espèces du genre *Leuconostoc* se révèle assez délicate car nombre d'entre elles sont étroitement apparentées (Garvie [19]). Toutefois, *Leuc. cremoris* se distingue aisément des autres espèces parce qu'il ne fermente que le glucose, le galactose et le lactose et *Leuc. lactis* parce qu'il acidifie le lait tournesolé. Les trois espèces de streptocoques sont très proches les unes des autres et certains spécialistes estiment maintenant que *S. cremoris*, *S. lactis* et *S. lactis* subsp. *diacetylactis* pourraient ne constituer qu'une seule espèce, les différences entre les souches résultant de la perte d'un ou de plusieurs plasmides.

Les levains mixtes ont été mis en cause comme agents responsables de la texture ouverte du fromage, en raison de la production de CO₂ à partir de citrate par les producteurs d'arôme [17, 51, 62, 65]. Pour cette raison de nouveaux types de levains ont été développés. Whitehead et ses collègues, en Nouvelle-Zélande, furent particulièrement actifs eu égard à ce problème, à la fin des années 30 et pendant les années 40, lorsqu'ils mirent en œuvre des levains constitués par des cultures pures [75]. Dans leur système («single-strain type of starter»), seules des cultures pures de *S. lactis* et de *S. cremoris* étaient utilisées alors que les bactéries aromatiques étaient mises de côté. Ils s'aperçurent très vite que ces levains constitués par des cultures pures étaient particulièrement prédisposés à la lyse phagique. Pour surmonter cet inconvénient, ils utilisèrent chaque jour deux cultures non apparentées sur le plan phagique. De nos jours, ce système met généralement en œuvre une rotation de quatre paires de souches, chaque paire comportant une souche « rapide » et une souche « lente ». Les deux termes rapide et lente se réfèrent à la vitesse de production de l'acide dans du lait à des températures de 35 à 40° C. La rotation est établie sur 4 jours de telle sorte qu'on utilise quatre paires de souches différentes et que, pendant l'intervalle de 4 jours, chaque paire n'est utilisée qu'une fois [35, 36]. Les principaux avantages d'un tel système de rotation des souches résident dans le fait qu'il y a moins d'échecs d'acidification dus aux phages et que la composition du levain est connue. Toutefois, des difficultés dues aux phages sont à nouveau survenues dans les usines les plus grandes où les cuves de fromagerie étaient réutilisées deux ou plusieurs fois par jour. C'est pourquoi le « levain multiple » («multiple-strain starter»), un nouveau type de levain, a été mis au point en Nouvelle-Zélande (Limsowtin *et al.* [40]). Ce levain multiple repose fondamentalement sur l'emploi de cinq ou six souches soigneusement sélectionnées, non apparentées sur le plan phagique et cultivées séparément jusqu'au stade culture-mère ou mieux jusqu'au stade levain proprement dit. Dans ces conditions, les souches ne se développent ensemble que pendant une dizaine de générations au plus et il est peu probable que l'une quelconque des souches devienne dominante. Ce système conjugue les avantages à la fois des

levains de cultures pures et des levains mixtes, puisqu'on utilise un levain de composition connue et que les différentes souches demeurent séparées jusqu'à un stade assez avancé de la préparation du levain, afin d'éviter le risque de dominance. Ce type de levain a été utilisé quotidiennement dans plusieurs fromageries de Nouvelle-Zélande tout au long d'une même campagne de fabrication* sans aucune perte d'activité acidifiante [40].

CROISSANCE DES LEVAINS LACTIQUES MESOPHILES DANS LE LAIT

Les streptocoques lactiques mésophiles et les leuconostocs constituent un groupe de micro-organismes particulièrement fastidieux. Outre la présence d'un sucre fermentescible, ils ont aussi besoin pour se développer de plusieurs vitamines, d'acides aminés et d'un système tampon capable de neutraliser les quantités élevées d'acide produites pendant la croissance. Les streptocoques exigent au moins six acides aminés (acide glutamique, valine, méthionine, leucine, isoleucine et histidine) pour croître. De nombreuses souches requièrent en outre la phénylalanine, la tyrosine, la lysine et l'alanine. Si le lait contient toutes les vitamines et le sucre (le lactose) nécessaires pour la croissance, il ne renferme que de petites quantités d'acides aminés libres et de peptides (0,01 p. 100), de l'ordre de 5 à 20 p. 100 de celles qui sont nécessaires pour obtenir un développement maximum dans un milieu synthétique [37]. Aussi ces streptocoques doivent-ils posséder une protéinase capable d'hydrolyser les protéines du lait. L'hypothèse communément acceptée est que cette protéinase se trouverait liée à la membrane cellulaire. Cette enzyme hydrolyse les protéines du lait en acides aminés et en peptides qui sont alors aisément transportés à l'intérieur des cellules. Une fois les peptides *in situ*, leur dégradation en acides aminés constitutifs se poursuit grâce aux peptidases intracellulaires.

Le transport des peptides chez les streptocoques lactiques a fait l'objet de plusieurs travaux récents [33, 34, 58]. Le transport d'un peptide devrait présenter quelque avantage pour la cellule, puisqu'il exige une dépense moindre d'énergie par résidu d'acide aminé transféré que le transport d'acides aminés libres. Chez de nombreux micro-organismes, des oligopeptides contenant six ou sept résidus d'acides aminés peuvent être transportés à l'intérieur des cellules. L'accumulation intracellulaire de tels peptides exogènes n'a pas été étudiée chez les streptocoques lactiques alors que le transport de tri- et de tétra-peptides a été mis en évidence chez ces germes. Les acides aminés

* En Nouvelle-Zélande, la production du lait destiné à la fromagerie est saisonnière et cesse complètement chaque année pendant 2 mois environ (juin et juillet) de l'hiver austral (NDT).

eux-mêmes sont de meilleurs promoteurs de la croissance que les peptides pour certaines souches, alors que pour d'autres souches on observe un effet inverse. Il a aussi été montré qu'une souche, qui se développait médiocrement en présence de dipeptides, présentait une croissance relativement satisfaisante avec des tripeptides comme source d'acides aminés essentiels (Law [34]). Il est encore loin d'être démontré que l'une des protéines du lait est dégradée préférentiellement ; il est toutefois vraisemblable que la spécificité de la protéinase est suffisamment large pour lui permettre d'utiliser indifféremment les diverses protéines du lait comme substrats. Le transport de peptides présentant des séquences d'acides aminés analogues à celles des protéines du lait mériterait d'être étudié chez les streptocoques lactiques.

De nombreuses cultures produisent avec une fréquence élevée (de l'ordre de 1 p. 100) des variants « lents » («slow coagulating» variants) qui ne coagulent le lait que lentement. La dénomination d'« acidifiants lents » («slow acid producers»), donnée à l'origine à ces variants, est à proscrire puisque de tels variants se développent et produisent de l'acide dans du lait à la même vitesse que la souche parentale mais s'arrêtent de croître à une densité bactérienne qui ne représente au mieux que 25 p. 100 de la densité maximale atteinte par la souche parentale. L'arrêt de la croissance de ces variants est en effet lié à l'épuisement rapide des faibles quantités d'acides aminés libres présentes dans le lait, et certains travaux suggèrent que ces variants ont perdu un plasmide codant la synthèse de la protéinase [37, 44].

Le sucre fermentescible du lait est le lactose, un disaccharide composé de glucose et de galactose, qui atteint des concentrations élevées (4 à 5 p. 100). En général, la quantité de lactate formée à la fin de la phase exponentielle ne dépasse guère 0,42 p. 100 (Cogan [10]), ce qui représente à peu près 0,41 p. 100 de lactose fermenté. Autrement dit, la teneur en lactose du lait dépasse très largement celle qui est requise pour la fermentation lactique. Chez les streptocoques lactiques, le transport du lactose à travers la membrane cellulaire met en jeu un système phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle le lactose aux dépens du phosphoénol pyruvate (PEP) [48, 49]. Les étapes de ce transfert sont les suivantes :

HPr est une protéine thermostable, FIII lac un facteur soluble spécifique du lactose et Enz. 2 une enzyme spécifique du lactose, liée à la membrane cellulaire. Enz. 1 et HPr sont des protéines constitutives alors que Enz. 2 et FIII lac sont induites pendant la croissance en présence de lactose ou de galactose. Dans la cellule, le lactose-phosphate est hydrolysé en glucose et galactose-6-phosphate par une

phospho- β -galactosidase, enzyme qui est également induite par la croissance sur lactose ou sur galactose. Le glucose est alors dégradé suivant la voie glycolytique habituelle tandis que le catabolisme du galactose-6-phosphate s'effectue selon une voie qui implique des dérivés du tagatose (un épimère du fructose) et qui aboutit aux trioses-phosphates, le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone-phosphate (Bisset et Anderson [6]). Des systèmes enzymatiques analogues ont été décrits chez d'autres bactéries, en particulier chez *Staphylococcus aureus* et chez *Escherichia coli*. Un travail récent (Romano *et al.*, [61]) suggère que le système PEP/PTS n'intervient pas dans la pénétration du glucose chez des micro-organismes tels que les leuconostocs. Dans le cas contraire ceux-ci, qui ne produisent qu'une mole de PEP par mole de glucose fermenté, utiliseraient tout le PEP formé, pour le transport du glucose. Toutefois, la mise en œuvre d'un système PEP/PTS qui assurerait la pénétration du lactose chez des leuconostocs, est possible au moins d'un point de vue théorique puisque deux moles de PEP seraient formées par mole de lactose fermenté. Les streptocoques utilisent la voie homofermentaire pour fermenter le lactose et pas moins de 90 p. 100 du sucre métabolisé sont convertis en acide lactique. Par contre, chez les leuconostocs, la fermentation du lactose détermine la formation de quantités équimoléculaires de lactate, d'éthanol et de CO_2 . Environ deux moles de lactate, deux moles d'éthanol et deux moles de CO_2 sont formées pour chaque mole de lactose fermenté. Des traces de formiate et d'acétate peuvent également être produites. Les différentes voies cataboliques empruntées par le lactose sont présentées dans la figure 1.

REGULATION DU METABOLISME DES SUCRES

Chez la plupart des bactéries, le métabolisme des sucres est soumis à une régulation. Il existe deux mécanismes fondamentaux de régulation, à savoir la répression et la rétroinhibition, étant entendu qu'on peut trouver des variantes de chacun d'eux. La répression affecte la synthèse des enzymes tandis que la rétroinhibition diminue les activités enzymatiques. Les gènes structuraux, qui codent la synthèse des enzymes inductibles, sont normalement inactifs ou réprimés. En présence d'un inducteur, il y a dérégulation parce que l'inducteur réagit avec le répresseur de façon à réduire l'affinité de celui-ci pour une séquence déterminée de l'ADN, l'opérateur, et à permettre la transcription et la traduction des gènes structuraux qui aboutit à la synthèse des enzymes correspondantes. Une telle régulation pourrait être qualifiée de « grossière ». Par contre, dans le cas de la rétroinhibition, l'activité d'une enzyme précoce d'une voie métabolique est inhibée par l'un des métabolites terminaux de cette voie. Ce mode de régulation immédiate de la chaîne métabolique pourrait être considéré comme une régulation « fine ». Celle-ci joue probablement un rôle plus important que la régulation grossière dans le métabolisme des cel-

fig. 1

Catabolisme du lactose chez les streptocoques lactiques et les leuconostocs.

lules en phase de croissance, puisque l'enzyme complémentaire, soumise à la régulation, est déjà présente dans de telles cellules.

Le PEP représente un maillon essentiel de la chaîne glycolytique puisqu'il intervient à la fois dans le transport du sucre, par l'entremise du système phosphotransférase, et dans le catabolisme ultérieur du sucre phosphorylé. Le pyruvate kinase (PK) des streptocoques est une enzyme allostérique qui est activée par tous les intermédiaires de la voie glycolytique, à partir de l'hexose-phosphate et jusqu'aux trioses-phosphates (Thomas [71]). L'action ainsi exercée sur l'activité de la PK peut régler la concentration intracellulaire du PEP et, ce faisant, la pénétration des sucres. Quand des cellules sont soumises à une carence glucidique, les teneurs en 3-phosphoglycérate, 2-phosphoglycérate et en PEP augmentent d'une façon notable alors que les autres intermédiaires de la glycolyse diminuent jusqu'à des concentrations indéterminables (Thompson et Thomas [72]). Dans ces conditions, la dégradation du PEP par la pyruvate kinase devrait être ralentie faute d'activateurs présents ; mais en se poursuivant lentement, cette dégradation permettrait cependant aux cellules de se procurer les petites quantités d'ATP nécessaires à leur entretien et à leur survie. En outre, puisque les cellules carencées contiennent encore du PEP, elles disposent d'une source d'énergie immédiatement utilisable pour assurer le transport de la source glucidique dès que celle-ci est à nouveau mise à la disposition de la cellule.

La lactate-déshydrogénase (LDH) des streptocoques est aussi une enzyme allostérique qui requiert la présence d'un hexose-1,6-diphosphate, tagatose- ou fructose diphosphate, pour être active. On a émis l'hypothèse que l'action de ces intermédiaires sur l'activité de la LDH permettait de maintenir la concentration interne du pyruvate à un niveau bas et, ce faisant, d'empêcher l'expression d'autres voies métaboliques dérivant du pyruvate. Cela expliquerait que la fermentation est homolactique [71]. Dans ce cas, du lactate est formé par la réaction terminale. Ainsi la glycolyse peut-elle se poursuivre puisque le coenzyme réduit NADH est réoxydé en NAD^+ qui peut entrer à nouveau dans la chaîne glycolytique. Cela est également vrai lorsqu'il se forme de l'éthanol — c'est le cas dans la voie hétérofermentaire (fig. 1) — mais les mécanismes de régulation impliqués dans cette voie restent encore à étudier.

MESURE DE LA CROISSANCE DANS LE LAIT

Pour mesurer la croissance bactérienne, la méthode la plus simple consiste à exprimer l'évolution du log du poids sec bactérien de la culture en fonction du temps. La courbe ainsi obtenue comporte une portion linéaire qui correspond à la phase exponentielle de croissance ; en outre, la pente de cette portion de droite est égale au taux de crois-

sance de la culture bactérienne. Les poids secs bactériens peuvent être aisément obtenus à partir des mesures de la densité optique de la culture bactérienne, à condition d'avoir tracé au préalable la courbe d'étalonnage qui traduit, pour un photomètre donné, la relation existant entre poids secs et densités optiques de la culture considérée. Dans de nombreux cas, cette relation n'est pas connue mais des courbes de croissance similaires peuvent être obtenues en exprimant le log de la densité optique en fonction du temps. Les déterminations photométriques ne peuvent pas être utilisées lorsque le milieu de culture est du lait en raison de son opacité. Toutefois, la production d'acide lactique et la densité optique des cultures évoluant de pair, il est possible de traduire la croissance d'une culture à l'aide d'une courbe qui exprime le log de la production de lactate en fonction du temps (Cogan [10]). Le lactate formé est mesuré très simplement par titrage. L'acidité titrable naturelle du lait, résultant de la présence des sels solubles et des protéines, est généralement voisine de 0,15 p. 100 et il importe d'exprimer la quantité réelle de lactate formé (acidité titrable acquise) en retranchant de tous les résultats obtenus l'acidité titrable naturelle du lait ou de tout autre milieu de culture. Sinon, la corrélation existant entre la croissance et la production d'acide ne serait pas mise en évidence. Le taux de croissance spécifique et le temps de doublement de la population peuvent être aisément calculés à partir de telles courbes [10]. Le temps de doublement est voisin de 2 h 25 min pour des levains cultivés à 21° C et de 1 h 13 min à 30° C. A 21° C, la production d'acide est généralement exponentielle lorsque l'acidité titrable acquise (ATA) est inférieure ou égale à 0,42 p. 100 (pH voisin de 4,9). La quantité maximale d'acide produite est voisine de 0,57 p. 100 (pH 4,6). A 30° C la production exponentielle d'acide cesse à une valeur plus faible (ATA voisine de 0,37 p. 100), en raison vraisemblablement d'un effet inhibiteur de la combinaison quantité d'acide et température, plus marqué à 30° C qu'à 21° C.

Cela dit, il est nécessaire de souligner que l'on ne doit utiliser la relation liant croissance et production d'acide qu'avec circonspection. Production d'acide et croissance peuvent en effet évoluer différemment lorsque les conditions de culture sont défavorables, par exemple à pH bas, à des températures élevées ou encore en présence de fortes teneurs en sel, comme cela a été montré pour certaines souches de streptocoques lactiques. Aussi la production d'acide n'est-elle pas à coup sûr le reflet direct de la croissance.

PRODUCTION D'AROME

Un certain nombre de composés, en particulier le diacétyl et probablement l'acétate et le CO₂, concourent de façon déterminante à la formation de l'arôme de divers produits laitiers. Tous résultent de la dégradation du citrate (fig. 2) encore que du CO₂ soit également

formé à partir du lactose par les leuconostocs, qui utilisent la voie hétérofermentaire de dégradation des sucres. Si le citrate n'est présent dans le lait qu'en faible quantité (environ 8,3 mM) il n'en représente pas moins un constituant clef.

fig. 2

Métabolisme du citrate chez *S. lactis* subsp. *diacetylactis* et chez les leuconostocs.

Ni *S. lactis* subsp. *diacetylactis* ni les leuconostocs ne peuvent utiliser le citrate comme source unique d'énergie mais ils sont capables de métaboliser le citrate en présence d'un sucre fermentescible. La pénétration du citrate dans la cellule met en jeu une enzyme inducible qui est pH-dépendante (Harvey et Collins [22]) ; une fois dans la cellule, le citrate est converti en acétate et en oxaloacétate par l'action d'une enzyme constitutive, la citratase (Harvey et Collins [23]). La majeure partie de l'acétate produit est excrétée tandis que l'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate et CO_2 . Le pyruvate est à son tour décarboxylé pour donner un complexe acétaldéhyde-TPP (ou « acétaldéhyde actif »). Ce complexe peut réagir avec une autre molécule de pyruvate pour former de l' α -acétolactate qui est à son tour décarboxylé pour donner naissance à de l'acétoïne. L'acétaldéhyde actif peut aussi réagir avec l'acétylcoenzyme A et donner directement du diacétyl (Speckman et Collins [66]).

L'acétoïne peut aussi être produite irréversiblement à partir du diacétyl par l'action d'une diacétyl réductase qui requiert du NADH (*S. lactis* subsp. *diacetylactis* ; Seitz et al., [64]) ou du NADPH (leuco-

nostocs ; O'Dowd et Cogan, résultats inédits) comme coenzyme. Le 2,3-butylène-glycol est formé à partir de l'acétoïne suivant une réaction réversible qui est catalysée par l'acétoïne réductase, une autre enzyme qui requiert du NADH ou du NADPH. Chez *Enterobacter aerogenes*, les deux activités réductrices proviennent de la même enzyme (Bryn *et al.* [8]), alors qu'on ignore ce qu'il en est chez les bactéries lactiques aromatiques. Des trois composés en C4-diacétyle, acétoïne et 2,3-butylène glycol, seul le diacétyle est aromatique. *S. lactis* subsp. *diacetylactis* produit plus d'acétoïne que de diacétyle en raison, semble-t-il, d'une vitesse limitée de la synthèse de l'acétylcoenzyme A (Collins et Bruhn [11]). En outre, l'activité de la diacétyle réductase doit également être prise en considération puisqu'elle peut réduire le diacétyle, au fur et à mesure qu'il est synthétisé, en acétoïne. Remarquons aussi qu'en l'absence de citrate, peu (ou pas) de diacétyle et d'acétoïne sont

fig. 3

Formation du diacétyle et de l'acétoïne et dégradation du citrate, au cours de la croissance de *S. lactis* subsp. *diacetylactis* DRC 1 dans du lait, à 21° C.

formés à partir du lactose bien que le pyruvate constitue aussi un intermédiaire clef du catabolisme des sucres. La raison en est que tout le pyruvate formé, qu'il provienne de la glycolyse ou de la voie hétérofermentaire, est converti en lactate ce qui permet de réoxyder le coenzyme réduit (passage du NADH au NAD⁺) et ce faisant, à la bactérie de poursuivre la fermentation. En présence de citrate et de lactose, les bactéries lactiques aromatiques produisent plus de pyruvate qu'il est nécessaire pour régénérer le coenzyme réduit. Cet excès de pyruvate, toxique pour la cellule, est éliminé sous forme de produits neutres tels que l'acétoïne et le diacétyle [23].

Les cultures pures de *S. lactis* subsp. *diacetylactis* et celles de leuconostocs se comportent d'une façon entièrement différente eu égard à la production de diacétyle et d'acétoïne (Cogan [9]). Dans du lait ou dans un bouillon contenant du citrate, *S. lactis* subsp. *diacetylactis* produit du diacétyle, de l'acétoïne et consomme le citrate dès que la croissance commence. La quantité maximale de diacétyle formé peut atteindre 8 µg/ml, mais elle varie beaucoup (moyenne : 3 à 4 µg/ml). La quantité d'acétoïne formée se situe habituellement autour de 200 µg/ml encore que certaines cultures puissent en produire 300 µg/ml. La somme des quantités d'acétoïne et de diacétyle formés atteint son maximum au moment où le citrate est complètement épuisé (fig. 3) ; ensuite, la production d'acétoïne est négligeable tandis que la teneur en diacétyle décroît en raison, vraisemblablement, de l'activité de la diacétyle réductase.

Par contre, les cultures pures de leuconostocs, qui ne se développent convenablement que dans du lait additionné d'extrait de levure (tab. 1), utilisent le citrate très rapidement. Mais elles ne produisent du diacétyle et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu acide. Ce comportement n'est pas facile à expliquer bien qu'il ait été montré qu'un pH élevé et des concentrations relativement fortes de lactose et de glucose (1-10 mM) inhibent la production d'acétoïne et stimulent l'utilisation du citrate (Cogan et O'Dowd, résultats inédits).

Dans du lait, les levains des types DL ou D métabolisent le citrate et produisent diacétyle et acétoïne d'une façon comparable aux cultures pures de *S. lactis* subsp. *diacetylactis*. Les teneurs maximales en diacétyle et en acétoïne coïncident avec la disparition du citrate. La teneur maximale en diacétyle peut atteindre 12 µg/ml mais elle varie beaucoup, la moyenne se situant à 4-5 µg/ml (Walsh et Cogan [74]). La production d'acétoïne peut s'élever jusqu'à 500 µg/ml, la production moyenne étant de 300 µg/ml. La production de diacétyle et d'acétoïne des levains du type L présente une phase de latence avant de devenir exponentielle. Les levains L produisent au maximum 5 µg/ml de diacétyle et 85-100 µg/ml d'acétoïne. Une comparaison de la production de diacétyle et d'acétoïne au cours de la croissance des levains DL et L est présentée sur la figure 4.

fig. 4

Etude comparée d'un levain DL et d'un levain L : formation du diacétyle, de l'acétone et du lactate ; dégradation du citrate.

La question se pose de savoir comment les levains du type L produisent du diacétyle et de l'acétone puisque les cultures pures de leuconostocs ne produisent aucun des deux composés. Cela résulte avant tout du fait que les leuconostocs ne se développent que lentement dans les levains mixtes cultivés sur du lait et qu'en conséquence le lait acidifié contient encore suffisamment de citrate pour que celui-ci serve de précurseur. L'évolution de la production d'acétate et de CO_2 en fonction du temps n'a pas été rapportée dans la littérature mais il est vraisemblable que la formation de ces composés doit aller de pair avec l'utilisation du citrate, celui-ci constituant leur principal précurseur. Dans les levains DL et D, le citrate est consommé beaucoup plus rapidement que dans les levains L parce que la croissance de *S. lactis* subsp. *diacetylactis* est beaucoup plus rapide que celle des leuconostocs. Dans les levains DL et D le citrate est totalement utilisé après 10 h d'incubation à 21° C (inoculum 2 p. 100) alors que dans les levains L il subsiste encore du citrate après 18 h d'incubation (fig. 4).

Dans les levains mixtes, une fois le citrate épuisé, survient une diminution des teneurs en diacétyle et en acétoïne, vraisemblablement par l'entremise des réductases qui conduisent à la formation du 2,3-butylène glycol. Cela signifie que diacétyle et acétoïne sont produits plus rapidement qu'ils ne sont détruits, de telle sorte que leur destruction n'est mise en évidence que lorsque leur synthèse cesse, une fois le précurseur complètement utilisé [74]. C'est pourquoi il importe de refroidir les produits laitiers frais juste au moment où le citrate est complètement utilisé, de façon à maintenir la teneur en diacétyle à un niveau élevé, en ralentissant sa réduction ultérieure.

Les travaux de l'équipe de Mc Kay [29, 44, 45, 47] suggèrent que les gènes codant la protéinase, le métabolisme du citrate et les étapes initiales de la fermentation du lactose sont localisés sur des plasmides*. Certaines cultures de bactéries lactiques perdent facilement ces plasmides, ce qui se traduit par une incapacité à se développer dans le lait et à y produire du diacétyle. Les résultats de Mc Kay *et al.* laissent aussi penser que la transduction** existe chez les streptocoques lactiques. Les implications pratiques de tels travaux sont à terme considérables puisqu'elles laissent entrevoir la possibilité de mettre au point des levains lactiques *ad hoc* en faisant appel au génie génétique.

BACTERIOPHAGE

La production d'acide des levains lactiques peut être entravée ou totalement inhibée par différents facteurs, par exemple par les inhibiteurs naturels du lait, par des acides gras libres, par la présence résiduelle d'antibiotiques, de détergents ou de désinfectants. Il s'avère toutefois que les bactériophages représentent les agents les plus fréquemment responsables de l'inhibition des levains lactiques.

L'infection d'une culture pure de bactéries lactiques par un phage lytique aboutit habituellement à la destruction quasi totale des cellules bactériennes et, ce faisant, à une inhibition complète de la production d'acide. Pour bien comprendre ce phénomène, on doit prendre en compte les caractéristiques de la multiplication du phage et celles des bactéries. La période de latence des phages, c'est-à-dire le temps qui s'écoule entre l'adsorption d'un phage sur une cellule bactérienne

* Les plasmides sont des fragments d'ADN circulaires qui peuvent exister dans la cellule bactérienne indépendamment de l'ADN chromosomique, se répliquer de manière autonome et être transférés d'une cellule bactérienne à une autre si celles-ci se trouvent en contact direct (NDT).

** La transduction est un autre mécanisme de transfert de gènes entre bactéries. Elle met en jeu, comme vecteurs, certains bactériophages. Ces phages peuvent « accrocher » des fragments de l'ADN de la bactérie-hôte à leur propre génome et les transmettre à d'autres bactéries au cours d'une infection ultérieure (NDT).

et la libération de nouvelles particules phagiques par lyse de cette cellule, varie d'un phage à un autre, mais a en moyenne une durée de 50 min. Le rendement unitaire moyen, c'est-à-dire le nombre de particules libérées par une cellule bactérienne, se situe au voisinage de 70 (Robertson [60]). Le temps de doublement des cultures de bactéries lactiques, s'il varie, est cependant voisin de 60 min [10]. Dans ces conditions, une culture infectée initialement à raison de un phage par ml produit approximativement $7,2 \times 10^8$ phages par ml en 4 h, alors que pendant la même période le nombre de bactéries n'augmente que de seize fois. Ce calcul, qui suppose que toutes les particules phagiques se multiplient (ce qui n'est pas tout à fait exact), traduit bien le caractère brutal et spectaculaire que revêt l'attaque d'une culture bactérienne par un phage lytique.

ORIGINE DES PHAGES

Jusqu'à un passé récent, l'origine des phages restait du domaine de la spéculation. Le lactosérum résiduel subsistant dans les cuves de fabrication ou dans les bidons utilisés pour transporter, de la fromagerie à la ferme, le lactosérum destiné à l'alimentation des porcs, les contaminations véhiculées par l'air et surtout les fines gouttelettes dispersées dans l'atmosphère de l'usine par les écrémeuses à lactosérum, étaient considérés comme les sources immédiates de phages [60]. Tout bien considéré, l'origine des phages restait toutefois insaisissable. Cependant, deux nouvelles sources de phages, à savoir le lait cru et les bactéries lysogènes, ont été mises en évidence récemment. Ce sont les chercheurs néo-zélandais qui ont montré que le lait cru était une source de phages, au moins pour *S. lactis* (Heap *et al.* [26]). Par contre, aucun phage attaquant *S. cremoris* n'a été isolé du lait cru. Au cours des années 70, plusieurs équipes de chercheurs ont d'autre part montré que la plupart des streptocoques lactiques étaient lysogènes [25, 28, 32, 41, 43, 52, 56]. La lysogénie a été mise en évidence en traitant des cultures en phase de croissance avec des agents inducteurs tels que le rayonnement ultra-violet ou la mitomycine C. Les culots de centrifugation des suspensions bactériennes soumises à l'induction contenaient des particules visibles au microscope électronique, particules dont la morphologie était identique à celle des phages. Toutefois il n'a été trouvé qu'un très petit nombre de souches indicatrices sensibles aux phages induits, ce qui laisse à penser que nombre d'entre eux sont défectifs. Ces résultats soulèvent deux questions : a) Comment l'induction se produit-elle en pratique et b) Sur quelles souches bactériennes les phages induits se multiplient-ils ? Les températures élevées et H_2O_2 sont capables d'induire des phages tempérés d'*E. coli* et il est loisible de penser que ces mêmes agents exercent les mêmes effets dans le cas des levains lactiques puisque ceux-ci peuvent produire de l'eau oxygénée et sont soumis à des trai-

tements thermiques relativement élevés au cours du chauffage du lait et de la fabrication du cheddar. En fait, Heap et Lawrence [24] ont montré que lorsqu'on ajoutait des phages à une culture de streptocoques lactiques incubée à 39° C, un nouveau phage lytique attaquant cette souche apparaissait après seulement deux repiquages alors qu'il fallait quatre à huit repiquages — parfois plus — pour que le nouveau phage apparaisse lorsque l'incubation était effectuée à 32° C. Il n'est pas sans intérêt de confronter ces résultats à ceux d'un travail hollandais déjà ancien de Galesloot et *al.* [18] qui montrait que des levains mixtes naturels utilisés dans des fromageries sans prendre aucune précaution pour prévenir les attaques phagiques, étaient moins sensibles aux attaques de phages que ces mêmes levains repiqués au laboratoire, dans de bonnes conditions d'asepsie. En l'absence, dans l'usine, de mesures préventives adéquates contre l'infection phagique des levains, celle-ci est hautement probable et pourrait conférer aux cultures un certain degré de résistance. Ce type de résistance n'a pas été plus amplement caractérisé, mais les chercheurs hollandais estiment que ces levains mixtes naturels, s'ils donnent satisfaction, doivent contenir des souches « porteuses » de phages. Certaines cultures libèrent spontanément des nombres relativement élevés de phages — jusqu'à 10^4 /ml [28]. Dans le même ordre d'idées, Stadhouders et *al.* [67] ont rapporté que certains de leurs levains mixtes naturels contiennent jusqu'à 10^8 phages/ml.

Les traitements thermiques classiques du lait n'ont qu'un effet limité sur les phages alors que la pasteurisation (71° C, 15 s) détruit par exemple complètement les cellules hôtes. Les traitements thermiques requis pour inactiver des bactéries, des phages ou des enzymes sont généralement exprimés à l'aide des paramètres D et Z. La valeur D ou temps de réduction décimale est le temps nécessaire pour obtenir, à une température donnée, un taux de destruction de 90 p. 100 du nombre initial de germes (soit une diminution d'un log décimal de la population). Lorsqu'on exprime graphiquement les $\log_{10}$ des germes survivants en fonction du temps de chauffage à une température donnée, on peut obtenir directement la valeur D sur l'axe des abscisses. En effet, la courbe de survie ainsi obtenue est habituellement une droite. Dans certains cas on obtient une courbe biphasique qui se décompose en deux portions de droite, la première dite « rapide » étant beaucoup plus pentue que la seconde qu'on dénomme « trainée ». La valeur Z est le nombre de degrés centigrades dont il faut augmenter (ou diminuer) la température de chauffage pour obtenir une réduction (ou une augmentation) de dix fois la valeur D. Cette valeur Z peut être obtenue directement sur l'axe des abscisses d'un graphique où l'on exprime le $\log_{10}$ de D en fonction de la température.

La thermorésistance des phages des streptocoques lactiques varie tellement d'un phage à un autre, quel que soit l'hôte bactérien considéré, qu'il n'est guère possible d'établir une quelconque généralisation (tab. 2). Notons que lorsque du lactosérum de fromagerie est rétro-

TABLEAU 2

Comparaison de la thermorésistance de quelques phages des streptocoques lactiques

Espèce	Phage	Composante*	Température (° C)	Valeur D (min)	Valeur Z (° C)	Références
<i>S. lactis</i>	C 2	rapide traînée	55 65	202 102	nd** 31	Koka et Mikolajcik [30]
<i>S. lactis</i>	C 10		65	9,9	5,8	
<i>S. lactis</i>	240		70	14	4,9	Zottola et Marth [77]
<i>S. lactis</i>	144 F		70	20	5,8	
<i>S. cremoris</i>	E 8	rapide traînée	65 65	0,6 1,9	5,8 10,2	Daoust <i>et al.</i> [15]
<i>S. cremoris</i>	C 1		65	1,1	5,8	
<i>S. cremoris</i>	R 1	rapide traînée	65 65	16 64	3,3 3,6	Koka et Mikolajcik [30]

* Composante dans le cas d'une courbe de survie biphasique (voir texte).

** nd : non déterminée. La valeur Z ne peut être calculée car on ne dispose dans ce cas que d'une valeur D.

cédé aux éleveurs et transporté dans des bidons ou des citernes qui peuvent être employés ultérieurement pour la collecte du lait, il est nécessaire de faire subir au lactosérum un traitement thermique à une température suffisamment élevée pour éviter que le récipient utilisé pour le transport ne constitue une source d'infection phagique pour le lait.

Les phages sont très sensibles à des désinfectants tels que le chlore et les iodophores. Ils sont par exemple rapidement inactivés par 200 ppm de chlore libre. Une pratique très recommandable est de traiter les surfaces qui vont être au contact du lait ou du fromage avec de l'eau javellisée (Lawrence et Pearce, [36]). Ce traitement désinfectant doit être appliqué aux cuves de fromagerie chaque matin avant le début de la fabrication et surtout entre chaque remplissage de cuve, afin de détruire les phages qui peuvent s'être multipliés au cours d'un cycle de fabrication. La figure 5 montre, à titre d'exemple, l'évolution d'un phage au cours de la fabrication du cheddar. Ce phage passe approximativement de 10^2 par ml à 10^7 ou 10^8 par ml pendant la fabrication. Bien que le nombre de phages présents dans le lactosérum ait atteint 10^5 par ml au début du soutirage du lactosérum, la qualité du fromage n'était pas affectée mais il n'a pas été précisé si ce nombre de phages ralentissait les étapes subséquentes de la fabrication. Pearce [53] a montré que pendant la fabrication du cheddar les phages étaient multipliés par un facteur constant qui était indépendant du nombre de phages initialement présents. Ce facteur de multiplication définit la virulence relative d'un phage, pour un procédé de fabrication donné. Pearce estime que le nivellement des titres phagiques qu'il observait au cours de la dernière phase de la fabrication, montre que la prolifération des phages dans le caillé est gouvernée par des facteurs physiques.

La littérature spécialisée est avare de données intéressant le seuil de la contamination phagique à partir duquel la durée de fabrication risque d'être affectée. En tout état de cause, l'infection phagique du levain est encore plus dangereuse que celle du lait de fabrication. Les données de Pearce [53] laissent à penser que 600 à 7 000 phages par ml de lait sont nécessaires pour ralentir la fabrication du cheddar alors que dans un travail ultérieur du même institut, d'autres chercheurs (Limsowtin et Terzaghi, [39]) ont affirmé qu'une infection phagique initiale de 100 particules par ml, perpétuée par un phage ayant un facteur de multiplication de 10^7 , pourrait sérieusement perturber l'acidification au cours de la fabrication du cheddar. Pearce *et al.* [54] ont observé que le nombre de phages présents dans le lactosérum au début du soutirage du lactosérum, pouvait varier de 100 fois, la moyenne étant voisine de 10^5 par ml. Ces auteurs ont calculé que cela traduisait une infection initiale de 5 à 500 particules phagiques par ml de lait et que, pour obtenir le titre le plus bas — 5 phages/ml — il suffisait que 0,01 ml d'un lactosérum « moyen » provenant du caillé au moment où celui-ci est broyé (« average mil-

fig. 5

Multiplication du phage de *S. lactis* ML 8 au cours de la fabrication du cheddar dans deux cuves différentes. A : coagulation ; B : décaillage ; C : début du soutirage du lactosérum ; D : fin du soutirage ; E : salage (d'après Pearce *et al.* [54]).

ling whey »), tombe dans une cuve de fabrication contenant 6 000 l de lait. Bien entendu, ces calculs présupposent que le levain est indemne de phages.

PREPARATION DES LEVAINS EN PRATIQUE

Les levains de fromagerie sont généralement fournis aux laiteries par des firmes commerciales spécialisées encore que dans certains pays, par exemple la Nouvelle-Zélande et l'Australie pour des levains composés de cultures pures ou les Pays-Bas pour des levains mixtes naturels de composition inconnue, les levains de fromagerie soient fournis par l'Institut de Recherches Laitières du pays. Certaines des plus grandes firmes laitières approvisionnent leurs usines avec des cultures de leur propre collection, ce qui leur permet de surveiller

fig. 6

Type de cuve hermétique couramment utilisée en Nouvelle-Zélande pour la préparation des levains lactiques (d'après Robertson [59]).

attentivement l'emploi de ces cultures tout en mettant en œuvre un système suffisamment souple.

Les premiers levains commerciaux étaient des cultures sur lait, envoyées chaque jour aux usines sous forme liquide. Le maintien de l'activité de tels levains ne dépassait guère 48 h même en les refroidissant à des températures suffisamment basses. Il était donc nécessaire de produire des levains possédant une meilleure qualité de conservation ce qui, d'un point de vue chronologique, a conduit à trois types principaux de levains (Tofte-Jespersen [73]) :

a) les levains secs, b) les levains lyophilisés et c) les levains congelés.

Dans les levains du type a, le lactosérum d'un levain cultivé sur du lait additionné de lactose et de carbonate de calcium était éliminé par pressage et le résidu était séché sous vide. Le taux de survie des bactéries ne dépassait guère 1 à 2 p. 100 après ce traitement. Dans le cas des levains lyophilisés, où l'eau est sublimée par séchage sous

vide, après congélation des cultures, le taux de survie est de l'ordre de 50 p. 100. Dans le cas des levains congelés, un travail de pionnier fut effectué par Lewis [38], dans le cadre de la mise au point d'une méthode de préparation des levains lactiques destinée à éviter l'infection phagique au cours de la préparation des levains dans les usines. Sa méthode consistait à ensemercer des fioles en plastique contenant du lait, après traitement thermique et refroidissement de celles-ci ; les fioles ensemencées étaient aussitôt congelées ; elles étaient décongelées et incubées au fur et à mesure des besoins et elles étaient utilisées pour ensemercer les cultures suivantes à l'aide d'appareillages spécialement conçus, comportant une double aiguille, qui permettent de prévenir les infections phagiques. La conservation des levains à -20°C , entraînait une perte d'activité acidifiante. Un progrès notable fut ensuite réalisé lorsqu'il fut démontré que la conservation des levains dans l'azote liquide, à -196°C , évitait toute perte d'activité acidifiante (Cowman et Speck, [14]) et peu après, que des suspensions concentrées congelées de bactéries lactiques furent préparées. Les travaux de Bergère et de ses collègues en France et de Speck *et al.* aux Etats-Unis (voir par ex. [3, 35]) permirent de progresser notablement dans la préparation des levains très concentrés. Les bactéries, cultivées sur un milieu convenable, étaient ensuite concentrées par centrifugation, puis resuspendues dans un petit volume de liquide et congelées dans l'azote liquide. Ces suspensions concentrées pouvaient alors être utilisées pour ensemercer directement le lait de fabrication, système qui a l'avantage de supprimer la préparation des levains à l'usine.

Pour en revenir à la préparation traditionnelle des levains, que l'on utilise au départ des cultures sèches ou congelées, plusieurs repiquages successifs, avec augmentation progressive du volume, sont généralement nécessaires avant de préparer les grandes quantités de levain proprement dit — 1 à 2 p. 100 du volume du lait de fromagerie — utilisées quotidiennement. Suivant la taille de l'usine, les différentes étapes de la préparation du levain peuvent s'étaler sur 3 ou 4 j.

Pour des raisons évidentes, le milieu utilisé est toujours du lait bien que celui-ci ne soit pas tout à coup le milieu optimal de croissance. On utilise de préférence de la poudre de lait exempt d'antibiotiques et d'autres résidus qui pourraient modifier les productions d'acide et d'arôme, poudre qui est reconstituée en général à raison de 10 p. 100 (p/v). Le lait une fois reconstitué est habituellement chauffé dans des cuves à levain spécialement conçues (Robertson [59]) (voir fig. 6), à $90-95^{\circ}\text{C}$ pendant 20 à 60 min, puis refroidi et ensemençé. Le chauffage exerce plusieurs effets. Il détruit tout ou partie de la flore de contamination du lait éventuellement présente et dont la croissance ultérieure pourrait être source de difficultés tant au stade du levain qu'à celui du fromage. Il détermine une croissance plus rapide du levain en raison de la dégradation partielle des protéines du lait, qui est source d'acide aminés et de peptides. En outre, les inhibiteurs

naturels du lait cru, connus sous le nom générique de lacténines, sont inactivés [1, 20, 76]. Parmi les lacténines, on distingue les agglutinines qui entraînent une agglutination des souches sensibles, suivie d'un dépôt au fond de la cuve d'un sédiment plus ou moins important constitué par des amas de bactéries agglutinées et de caséine coagulée ; cette sédimentation s'accompagne d'un développement irrégulier du levain lactique et retarde l'acidification (Emmons *et al.*, [16]). Ce défaut est particulièrement marqué dans la fabrication du cottage cheese. La principale lacténine est constituée par un système d'inhibition associant la lactoperoxydase et le thiocyanate (SCN^-) naturellement présents l'un et l'autre dans le lait cru, avec l'eau oxygénée produite par de nombreuses bactéries lactiques lorsqu'elles sont cultivées sur du lait suffisamment aéré. On observe alors une inhibition maximale des souches sensibles si le thiocyanate et H_2O_2 sont en proportions équimoléculaires. La nature exacte du composé inhibiteur n'a pas été élucidée en dépit de plusieurs travaux détaillés [27, 50]. Toutefois, tous les streptocoques lactiques ne sont pas inhibés par ce système (Auclair et Portmann [2]), ce qui est heureux sur le plan pratique.

Dès que le refroidissement du lait chauffé commence, de l'air filtré stérile est admis dans la cuve à levain, pour éliminer les phages présents dans l'air ambiant, jusqu'à ce que la température du lait atteigne 21°C , c'est-à-dire la température d'incubation. Pour améliorer encore l'efficacité du traitement thermique en vue de détruire les phages, il est conseillé d'injecter de la vapeur directement dans le volume mort, non occupé par du lait, de la cuve à levain. Cette injection de vapeur déplace l'air de la cuve et permet de porter la partie haute de la cuve à une température voisine de 95°C . On ne doit en effet pas oublier que les phages présents dans des films de lait desséchés sont particulièrement thermorésistants. Robertson [59] a par exemple montré que du phage était complètement détruit par un chauffage à 88°C pendant 90 s s'il s'agissait d'une suspension dans du lait écrémé mais qu'il fallait chauffer des films desséchés de lait pendant plus de 4 h à 88°C pour obtenir une destruction complète.

Deux procédés d'ensemencement sont couramment utilisés. Le premier procédé met en œuvre une arrivée de vapeur ou un « anneau d'alcool enflammé » entourant l'orifice d'ensemencement. On ouvre cet orifice et l'inoculum est rapidement versé à travers un « lit » de vapeur ou de flammes. Dans le second procédé, le goulot du flacon contenant la culture-mère, une fois le flacon retourné, est rapidement et fortement appuyé sur la soupape à clapet, à travers un bain d'eau javellisée recouvrant la soupape. Celle-ci s'ouvre, permettant ainsi à l'inoculum de s'écouler dans la cuve à levain ; lorsqu'on retire le flacon, la soupape se referme. En pratique, la manœuvre n'entraîne, au pire, qu'un peu d'eau javellisée dans la cuve à levain, eau javellisée qui est inactivée au contact du lait. Le taux d'ensemencement employé varie de 0,1 à 1 p. 100 et la température d'incubation choisie est géné-

ralement 21° C bien que la température optimale de croissance soit plutôt voisine de 28-30° C et que de nombreuses souches puissent encore se développer à 40° C.

Les levains sont incubés à 21° C pendant une durée permettant d'atteindre une acidité titrable acquise voisine de 0,57 p.100, alors que, rappelons-le, la production exponentielle d'acide s'arrête à une acidité titrable acquise voisine de 0,43 p.100 [10]. Cela demande environ 12 à 14 h et c'est peut-être l'une des raisons pour lesquelles on incube les levains à 21° C puisque cela permet d'incuber le levain pendant la nuit. Une fois que le levain a atteint l'acidité recherchée, on le refroidit et on peut l'utiliser pendant plusieurs jours. Le maintien des levains acides à température ambiante pendant de longues périodes s'accompagne généralement d'un retard de l'acidification ultérieure mais n'en modifie pas le taux de production, en raison du fait qu'une partie de la flore lactique du levain est, semble-t-il, inactivée par l'accumulation d'acide lactique et (ou) par le bas pH du levain.

Résumé

Cette revue est consacrée aux levains lactiques mésophiles. Elle traite successivement la composition des levains, les caractéristiques taxonomiques permettant de distinguer les différentes espèces composantes de ces levains, le métabolisme azoté et le catabolisme du lactose en relation avec la croissance des levains dans le lait, la régulation de la glycolyse. La dégradation du citrate du lait est examinée d'une façon détaillée. Les problèmes posés par l'infection phagique des levains, le rôle de la lysogénie comme source principale des phages présents dans les laiteries sont également discutés. Enfin, la préparation des levains à l'usine est aussi examinée.

Summary

MESOPHILIC LACTIC STARTERS. A REVIEW

Several important aspects of mesophilic starter cultures are reviewed. Single-strain, multiple-strain and the different types of mixed-strain starters are discussed and simple tests to distinguish the different bacteria present in such cultures are given. The importance of nitrogen and lactose metabolism in growth of starter cultures in milk is briefly treated as is the control of glycolysis. Citrate metabolism and the production of diacetyl and acetoin are considered in some depth. Inhibition of starters by bacteriophage, the role of lysogeny as the major source of bacteriophage in the factory environment and the practical production of starters in the cheese factory are also considered.

Reçu pour publication en mai 1980.

Bibliographie

- [1] AUCLAIR (J. E.) (1954). — The inhibition of microorganisms by raw milk. 3. Distribution and properties of two inhibitory substances. *J. Dairy Res.*, 21, 323-336.
- [2] AUCLAIR (J. E.) et PORTMANN (A.) (1959). — Action inhibitrice des lacténines sur les streptocoques lactiques des levains de fromagerie. *XV^e Congr. Int. Lait.*, 2, 580-586.
- [3] BERGÈRE (J. L.) (1968). — Production massive de cellules de streptocoques lactiques. 3. Production de différentes souches en culture à pH constant. *Le Lait*, 48, 131-139.
- [4] BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1974). — Eds. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. 8th Edn., p. 507, Williams & Wilkins.
- [5] VAN BEYNUM (J.) and PETTE (J. W.) (1936). — De beteekenis der melkzuurbacterien bij de boteraromavorming. *Versl. Landbouwk. Ond.*, 42, 361-392.
- [6] BISSET (D. L.) and ANDERSON (R. L.) (1974). — Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci: Presence of enzymes for both the D-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6-phosphate pathways. *J. Bacteriol.*, 117, 318-320.
- [7] BOEKHOUT (F. W. J.) and OTT DE VRIES (J. J.) (1919). — Aromabildner bei der Rahmsauerung. *Zentrallblatt f. bakteriol.*, 49, 373-382.
- [8] BRYN (K.), HETLAND (O.) and STROMER (F. C.) (1971). — The reduction of diacetyl and acetoin in *Aerobacter aerogenes*. Evidence for one enzyme catalysing both reactions. *Eur. J. Biochem.*, 18, 116-119.
- [9] COGAN (T. M.) (1975). — Citrate utilization in milk by *Leuconostoc cremoris* and *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Res.*, 42, 139-146.
- [10] COGAN (T. M.) (1978). — Determination of growth rates of lactic starter cultures. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 2, 105-115.
- [11] COLLINS (E. B.) and BRUHN (J. C.) (1970). — Roles of acetate and pyruvate in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Bacteriol.*, 103, 541-546.
- [12] CONN (H. W.) (1889). — Bacteria in milk, cream and butter and the ripening of cream. *Conn. Agric. Exp. Sta. Ann. Rep.*, 2, 57.
- [13] CONN (H. W.) (1890). — Bacteria in milk, cream and butter. *Conn. Agric. Exp. Sta. Ann. Rep.*, 3, 157.
- [14] COWMAN (R. A.) and SPECK (M. L.) (1965). — Ultra low temperature storage of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 48, 1531-1532.
- [15] DAoust (D. R.), EL-BISI (H.) and LITSKY (W.) (1965). — Thermal destruction characteristics of a lactic streptococcal bacteriophage. *Appl. Microbiol.*, 13, 478-485.
- [16] EMMONS (D. B.), ELLIOTT (J. A.) and BECKETT (D. C.) (1966). — Effect of lactic-streptococcal agglutinins in milk on curd formation and manufacture of cottage cheese. *J. Dairy Sci.*, 49, 1357-1366.
- [17] GALESLOOT (Th. E.) (1950). — An early gas defect in cheese caused by *Betacoccus (Leuconostoc)* species. *Neth. Milk Dairy J.*, 4, 274-287.
- [18] GALESLOOT (Th. E.), HASSING (F.) and STADHOUDERS (J.) (1966). — Differences in phage sensitivity of starters propagated in practice and in a dairy research laboratory. *XVII^e Congr. Int. Lait.*, D, 491-498.
- [19] GARVIE (E. I.) (1960). — The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27, 283-292.

- [20] GREENE (V. W.) and JEZESKI (J. J.) (1957). — Studies on starter metabolism. 2. The influence of heating milk on the subsequent response of starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 40, 1053-1061.
- [21] HAMMER (B. N.) and BAILEY (D. E.) (1919). — The volatile acid production of starters and of organisms isolated from them. *Iowa State Coll. Res. Bulletin*, n° 55.
- [22] HARVEY (R. J.) and COLLINS (E. B.) (1962). — Citrate transport system of *Streptococcus diacetilactis*. *J. Bacteriol.*, 83, 1005-1009.
- [23] HARVEY (R. J.) and COLLINS (E. B.) (1963). — The citratase of *Streptococcus diacetilactis*. Substrate Products and Equilibrium. *J. Biol. Chem.*, 238, 2648-2653.
- [24] HEAP (H. A.) and LAWRENCE (R. C.) (1976). — The selection of starter strains for cheesemaking. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 11, 16-20.
- [25] HEAP (H. A.) and LAWRENCE (R. C.) (1977). — The contribution of starter strains to the level of phage infection in a commercial cheese factory. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 12, 213-218.
- [26] HEAP (H. A.), LIMSOWTIN (G. K. Y.) and LAWRENCE (R. C.) (1978). — Contribution of *Streptococcus lactis* strains in raw milk to phage infection in commercial cheese factories. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 13, 16-22.
- [27] HOGG (D. McC.) and JAGO (G. R.) (1970). — The antibacterial action of lactoperoxidase. The nature of the bacterial inhibitor. *Biochem. J.*, 117, 779-790.
- [28] HUGGINS (A. R.) and SANDINE (W. E.) (1977). — Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Appl. Env. Microbiol.*, 33, 184-191.
- [29] KEMPLAR (G. M.) and McKAY (L. L.) (1979). — Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetilactis*. Evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 316-323.
- [30] KOKA (M.) and MIKOLAJCIK (E. M.) (1967). — Kinetics of thermal destruction of bacteriophages against *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 50, 1025-1031.
- [31] KOKA (M.) and MIKOLAJCIK (E. M.) (1970). — Kinetics of thermal destruction of bacteriophages active against *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 53, 853-856.
- [32] KOZAK (W.), RAJCHERT-TRZPIL (M.), ZAJDEL (J.) and DOBRZANSKI (W. T.) (1973). — Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Appl. Microbiol.*, 25, 305-308.
- [33] LAW (B. A.) (1977). — Dipeptide utilization by starter streptococci. *J. Dairy Res.*, 44, 309-317.
- [34] LAW (B. A.) 1978. — Peptide utilization by group N streptococci. *J. gen. Microbiol.*, 105, 113-118.
- [35] LAWRENCE (R. C.) (1977). — Selection of starter strains. *Proc. 50th Jubilee Conference on Dairy Sci. Techn.* Palmerston North, New Zealand, p. 175.
- [36] LAWRENCE (R. C.) and PEARCE (L. E.) (1972). — Cheese starters under control. *Dairy Industries*, 37, 73-78.
- [37] LAWRENCE (R. C.), THOMAS (T. D.) and TERZAGHI (B. E.) (1976). — Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *J. Dairy Res.*, 43, 141-193.
- [38] LEWIS (J. E.) (1956). — A new approach to the problem of phage control during the production of commercial cheese starters. *J. Soc. Dairy Technol.*, 9, 123-128.

- [39] LIMSOWTIN (G. K. Y.) and TERZAGHI (B. E.) (1976). — Phage resistant mutants: their selection and use in cheese factories. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 11, 251-256.
- [40] LIMSOWTIN (G. K. Y.), HEAP (H. A.) and LAWRENCE (R. C.) (1977). — A multiple starter concept for cheesemaking. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 12, 101-106.
- [41] LOWRIE (R. J.) (1974). — Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Appl. Microbiol.*, 27, 210-217.
- [42] MATUSZEWSKI (T.), PIJANOWSKI (E.) and SUPINSKA (J.) (1936). — *Streptococcus diacetilactis* n.sp. i jego zastosowanie przy wyrobie masła. *Roczniki Nauk Rolniczych I Lesnych* (Polish Agric. Forest Annual), 36, 1-28.
- [43] MCKAY (L. L.) and BALDWIN (K. A.) (1973). — Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C 2 by ultraviolet radiation. *Appl. Microbiol.*, 25, 682-684.
- [44] MCKAY (L. L.) and BALDWIN (K. A.) (1974). — Simultaneous loss of proteinase and lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Appl. Microbiol.*, 28, 342-346.
- [45] MCKAY (L. L.) and BALDWIN (K. A.) (1975). — Plasmid distribution and evidence for a proteinase plasmid in *Streptococcus lactis* C 2. *Appl. Microbiol.*, 29, 546-548.
- [46] MCKAY (L. L.) and BALDWIN (K. A.) (1978). — Stabilization of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C 2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 360-367.
- [47] MCKAY (L. L.), BALDWIN (K. A.) and ZOTTOLA (E. A.) (1972). — Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Microbiol.*, 23, 1090-1096.
- [48] MCKAY (L. L.), WALTER (L. A.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1969). — Involvement of phosphoenolpyruvate in lactose utilization by group N streptococci. *J. Bacteriol.*, 99, 603-610.
- [49] MCKAY (L. L.), MILLER (A.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1970). — Mechanisms of lactose utilization by lactic streptococci: enzymatic and genetic analyses. *J. Bacteriol.*, 102, 804-809.
- [50] ORAM (J. D.) and REITER (B.) (1966). — The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The oxidation of thiocyanate and the nature of the inhibitory compound. *Biochem. J.*, 100, 382-388.
- [51] OVERCAST (W. W.) and ALBRECHT (T. W.) (1952). — Gas production in Cheddar cheese caused by *Leuconostoc citrovorum*. *J. Dairy Sci.*, 35, 554-558.
- [52] PARK (C.) and MCKAY (L. L.) (1975). — Induction of prophage in lactic streptococci isolated from commercial dairy starter cultures. *J. Milk Food Technol.*, 38, 594-597.
- [53] PEARCE (L. E.) (1974). — The multiplication of bacteriophages for lactic streptococci during cheesemaking. *XIX^e Congr. Int. Lait.*, 1E, 411.
- [54] PEARCE (L. E.), LIMSOWTIN (G. K. Y.) and CRAWFORD (A. M.) (1970). — Bacteriophage multiplication characteristics in Cheddar cheesemaking. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 5, 144-150.
- [55] PEEBLES (M. M.), GILLILAND (S. E.) and SPECK (M. L.) (1969). — Preparation of concentrated lactic streptococcus starters. *Appl. Microbiol.*, 17, 805-810.
- [56] REITER (B.) and KIRIKOVA (M.) (1976). — The isolation of a lysogenic strain from a multiple strain starter culture. *J. Soc. Dairy Technol.*, 29, 221-225.
- [57] REITER (B.) and ORAM (J. D.) (1962). — Nutritional studies on cheese starters. 1. Vitamin and amino acid requirements of single strain starters. *J. Dairy Res.*, 29, 63-77.
- [58] RICE (G. H.), STEWART (F. H. C.), HILLIER (A. J.) and JAGO (G. R.) (1978). — The uptake of amino acids and peptides by *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Res.*, 45, 93-107.

- [59] ROBERTSON (P. S.) (1966). — Some cheese starter handling techniques. *Dairy Industries*, 31, 805-809.
- [60] ROBERTSON (P. S.) (1966). — Bacteriophage control and detection. *Dairy Industries*, 31, 900-905.
- [61] ROMANO (A. H.), TRIFONE (J. D.) and BRUSTOLON (M.) (1979). — Distribution of the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *J. Bacteriol.*, 139, 93-97.
- [62] SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and ANDERSON (A. W.) (1959). — Taxonomic study of high carbon dioxide producing lactic acid streptococci isolated from mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 42, 799-808.
- [63] SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and HAYS (H.) (1962). — Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Canad. J. Microbiol.*, 8, 161-174.
- [64] SEITZ (E. W.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and DAY (E. A.) (1963). — Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptococcus diacetilactis*. *Canad. J. Microbiol.*, 9, 431-441.
- [65] SHERWOOD (I. R.) (1939). — The relation of certain lactic acid bacteria to open texture in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 10, 326-335.
- [66] SPECKMAN (R. A.) and COLLINS (E. B.) (1968). — Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.*, 95, 174-180.
- [67] STADHOUDERS (J.), BANGMA (A.) and DRIESSEN (F. M.) (1975). — Control of acid production in cheese manufacture. *NIZO nieuws*, n° 11 & 12.
- [68] STORCH (V.) (1890). — Nogle Undersogelser Over Flodens Syrning. *18de Beretning fra Laboratorium for landokonziske Fursog*. Copenhagen, Denmark.
- [69] STORCH (V.) (1919). — Fortsatte Undersfgelsen over Fremstillingen at Syrevaekkere. *102de Beretning fra Forsogslaboratoriet*, Copenhagen, Denmark.
- [70] SWARTLING (P. F.) (1951). — Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, 256-267.
- [71] THOMAS (T. D.) (1976). — Regulation of lactose fermentation in group N streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 474-478.
- [72] THOMPSON (J.) and THOMAS (T. D.) (1977). — Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 130, 583-595.
- [73] TOFTE-JESPERSEN (N. J.) (1974). — Recent developments in dairy starter cultures. *S. Afr. J. Dairy Technol.*, 6, 63-68.
- [74] WALSH (B.) and COGAN (T. M.) (1973). — Diacetyl, acetoin and acetaldehyde production by mixed-species lactic starter cultures. *Appl. Microbiol.*, 26, 820-825.
- [75] WHITEHEAD (H. R.) (1953). — Bacteriophage in cheese manufacture. *Bacteriol. Reviews*, 17, 109-123.
- [76] WRIGHT (R. C.) and TRAMER (J.) (1958). — Factors influencing the activity of cheese starters. The role of lactoperoxidase. *J. Dairy Res.*, 25, 104-118.
- [77] ZOTTOLA (E. A.) and MARTH (E. H.) (1966). — Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 49, 1338-1342.
-