



LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- J. KEILLING, J. CASALIS, G. SAVIGNAC et G. DUBREUIL.
— Sur une altération superficielle des fromages à pâte molle et croûte fleurie provoquée par *Penicillium funiculosum* 241
- R. PIERRET, A. BRETON et G. GAUDIER. — Les méthodes de conservation du lait de femme 250
- G. MOCQUOT. — Aspects technique et hygiénique du problème des laits destinés à la consommation 265

Supplément technique :

- G. GÉNIN. — L'insolubilisation et le durcissement des crins de caséine 276

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres 294

- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 298
- 3^o Brevets 348

Bulletin bibliographique :

- 1^o Les livres 350
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 351
- 3^o Brevets 357

Documents et informations :

- M. BEAU. — La situation laitière 360
- Les fromages anglais 364
- Première usine de lait au Nicaragua 365
- Pertes de matière grasse à la laiterie 367
- Résultats de l'insémination artificielle aux Etats-Unis 367
- Le bétail danois 368
- Quelques renseignements statistiques 368

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

SUR UNE ALTÉRATION SUPERFICIELLE DES FROMAGES A PÂTE MOLLE ET CROÛTE FLEURIE PROVOQUÉE PAR « *PENICILLIUM FUNICULOSUM* »

par

J. KEILLING, J. CASALIS, G. SAVIGNAC ET G. DUBREUIL

Laboratoire d'Industries Agricoles à l'Institut National Agronomique

I. — DESCRIPTION DE L'ACCIDENT

Sous le feutrage du *Penicillium candidum*, entre le mycelium et la surface de la pâte proprement dite des fromages à pâte molle et croûte fleurie, apparaissent parfois des taches violettes de 2 à

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

3 millimètres de diamètre. Ces taches peuvent être isolées ou réunies pour former des plages colorées de plus ou moins grande importance, dont la pigmentation diffuse progressivement tant vers l'intérieur de la pâte que vers la surface de la croûte (fig. 1).

L'accident se manifeste le plus souvent en fin d'affinage — en particulier lorsque celui-ci est conduit à basse température — ou lors du stockage des fromages en chambre froide.

L'examen microscopique direct des taches violettes met en évidence, la présence simultanée de moisissures appartenant au groupe *Penicillium* et de bactéries.

*
* *

II. — ISOLEMENT DE LA MOISSURE RESPONSABLE DE L'ALTÉRATION

A. Recherche d'un milieu de culture

Pour séparer les moisissures des bactéries, des essais d'isolement ont été effectués en boîtes de Petri sur les milieux gélosés habituellement utilisés en bactériologie laitière :

- a) lait écrémé dilué au 1/3 digéré par la papaïne ;
- b) lactosérum ;
- c) caséinate de calcium.

Sur ces milieux, des colonies de moisissures apparaissent au bout d'une dizaine de jours de séjour à la température de 20° C. A côté de *Penicillium candidum*, principal constituant de la flore superficielles des fromages à croûte fleurie, apparaissent des colonies dont la coloration vert pâle uniforme, avec une auréole blanche, grise ou blanchâtre, varie selon les milieux de culture utilisés. Si l'on examine la face inférieure de ces colonies, on constate une pigmentation brune plus ou moins accentuée. Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques de ces colonies montrent que cette moisissure appartient au groupe des *Penicillium*.

Mais les différents milieux énumérés ci-dessus se sont montrés peu favorables à la croissance de la moisissure dont les colonies restent chétives, peu florissantes, et sur aucun d'entre eux n'est apparue la pigmentation violette caractéristique de l'accident étudié.

Par contre, si l'on ajoute à l'un de ces milieux une faible quantité de matière grasse provenant du lait, on obtient après un séjour de 15 jours à la température de 20° C., une culture florissante dont la pigmentation franchement violette est analogue à celle que l'on observe sur les fromages.

Le milieu qui, à l'expérience, s'est révélé le plus favorable à

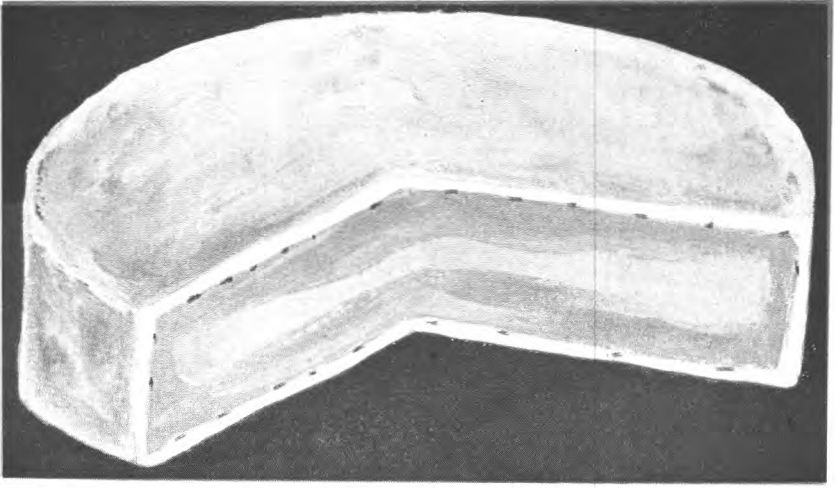


Fig. 1

Camombert présentant des taches violettes.

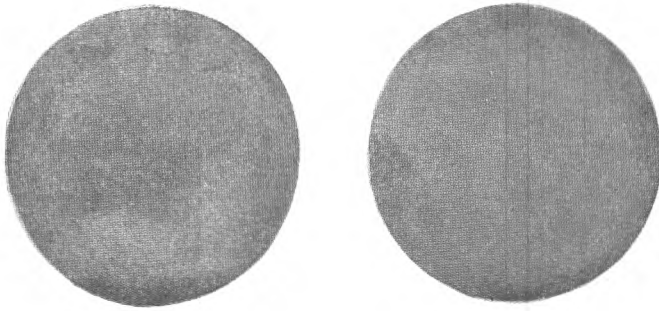


Fig. 2

A. — Face supérieure de la culture.

B. — Face inférieure de la culture.

l'étude de la moisissure, est le milieu gélosé au caséinate de calcium additionné de beurre, préparé conformément à la technique ci-après :

B. Préparation du milieu de culture

1° Produits et réactifs nécessaires :

- Caséine lactique de bonne qualité ;
- Solution ammoniacale : 5 cm³ d'ammoniaque pur (à 22° B.) dans 1 litre d'eau distillée ;
- Solution chlorhydrique : 5 cm³ d'acide chlorhydrique (densité 1,125) dans 1 litre d'eau distillée ;
- Eau de chaux ;
- Beurre ;
- Gélose.

2° Préparation des constituants du milieu :

a) *Caséine* : dans une capsule de 5 litres, contenant 500 cm³ d'eau distillée, verser lentement 40 grammes de caséine, en agitant au moyen d'un fouet de façon à éviter toute formation de grumeaux.

Quand la suspension de caséine est homogène, ajouter très progressivement sous agitation, une quantité de solution ammoniacale suffisante pour amener à 7,5 le pH du mélange.

Ramener à pH 4,8 en utilisant la solution chlorhydrique. Filtrer. Rincer plusieurs fois la caséine, avec de l'eau distillée.

Verser la caséine ainsi traitée dans un mortier, ajouter de l'eau de chaux filtrée de façon à obtenir une pâte en broyant au pilon, et amener à pH 7. Maintenir à 4° C. le produit ainsi obtenu, pendant 12 heures. Vérifier le pH qui ne doit pas avoir varié. Compléter à 1.000 cm³ avec de l'eau distillée. Répartir en tubes par 10 cm³. Stériliser 20 minutes à 118° C.

b) *Gélose double* : faire fondre à l'autoclave, 30 grammes de gélose en fibre, dans 1 litre d'eau. Filtrer à chaud. Répartir en tubes par 10 cm³. Stériliser 20 minutes à 120° C.

c) *Beurre* : faire fondre à feu doux, 125 grammes de beurre. Laisser décanter. Répartir la couche grasse en tubes. Stériliser à l'autoclave 20 minutes à 118° C.

3° Préparation du milieu proprement dit :

Faire fondre au bain-marie les tubes de gélose doublé. Refroidir à 60° C. Ajouter aseptiquement 1 cm³ de matière grasse dans chaque tube. Agiter énergiquement de façon à réaliser un mélange aussi homogène que possible. Introduire aseptiquement le mélange dans une boîte de Petri stérile où au préalable ont été versés aseptiquement 10 cm³ de caséinate. Refroidir le plus rapidement possible pour éviter la séparation de la matière grasse.

C. Ensemencement et isolement

Broyer dans un tube d'eau stérile, contenant des perles de verre, un fragment de la tache colorée à étudier. Ensemencer, dans les boîtes de Petri comme il a été indiqué ci-dessus, 1 cm³ de différentes dilutions de cette suspension microbienne. Après un séjour de 10 jours environ à 20° C., des colonies de moisissures occupent la surface des milieux de culture. La pigmentation caractéristique atteint son maximum d'intensité au bout de 15 à 20 jours.

* * *

III. — ÉTUDE DE LA MOISSURE

A. Caractéristiques

1° *Aspect macroscopique*: sur milieu au caséinate additionné de matière grasse, les cultures pures de la moisissure donnent un feutrage vert dont l'aspect rappelle celui des cultures de *Penicillium glaucum*. La face inférieure des colonies présente au bout de 15 jours environ, la pigmentation violette caractéristique (fig. 2).

2° *Aspect microscopique*: L'examen au microscope permet de constater :

a) que le mycelium est formé de filaments fins et cloisonnés (fig. 3A) ;

b) que les spores rondes dont le diamètre est d'environ 2,5 μ sont groupées en pinceaux (fig. 3B).

La moisissure a été identifiée par les soins du Professeur DUCHE au Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National Agronomique, comme étant *Penicillium funiculosum*.

B. Pigmentation spécifique

Avant d'affirmer que *Penicillium funiculosum* était seul responsable de l'accident étudié, il a paru nécessaire de comparer son développement à ceux des deux moisissures le plus fréquemment rencontrées en industrie fromagère : *Penicillium glaucum*, *Penicillium candidum*.

Pour cette étude, nous avons choisi dans nos collections, trois souches de *Penicillium glaucum*: PG 2, PG 8, PG 15 et trois souches de *Penicillium candidum*: PC 1, PC 4, PC 14, couramment utilisées en fromagerie, qui ont étéensemencées séparément et en culture pure sur les milieux gélosés suivants :

1° *Milieux non gras* :

- a) lait écrémé dilué au 1/3 digéré par la papaïne ;
- b) lactosérum ;
- c) caséinate de calcium.

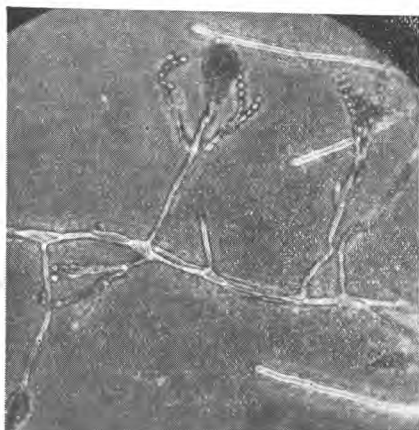


Fig. 3A. — *Penicillium funiculosum*: filaments mycéliens; conidiophores avec conidies.

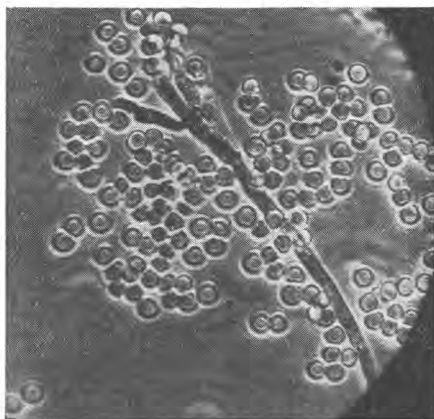


Fig. 3B. — *Penicillium funiculosum*: spores.

2° Milieux gras :

- a) lait écrémé dilué au 1/3 digéré par la papaïne, additionné de beurre ;
- b) lactosérum additionné de beurre ;
- c) caséinate de calcium additionné de beurre.

L'observation quotidienne des différentes cultures placées à l'étuve, à 20°, a permis de constater :

- 1° Que toutes les souches étudiées se développent plus rapidement et plus vigoureusement sur les milieux gras ;
- 2° Que seul *Penicillium funiculosum* provoque au bout de 15 jours, sur milieux gras, l'apparition de la pigmentation violette.

C. Influence de différents facteurs sur la croissance de la moisissure

1° Résistance au chauffage :

Une suspension de spores de *Penicillium funiculosum* contenant 300.000 spores par centimètre cube, est répartie dans des aiguilles de verre scellées. Ces aiguilles sont soumises pendant des temps variables à une immersion dans des bains d'eau à différentes températures.

Les résultats de ces essais sont résumés dans le tableau I où la survie et la destruction de la moisissure sont respectivement représentées par les signes + et —.

TABLEAU I

Température de chauffage en degrés C.	Temps de chauffage en minutes			
	1'	5'	10'	15'
57°	+	+	+	+
58°	+	+	+	+
59°	+	+	+	+
60°	—	—	—	—
61°	—	—	—	—

Penicillium funiculosum ne résiste pas à un traitement thermique supérieur à 60° pendant une minute.

2° Antiseptiques :

Une suspension de spores de *Penicillium funiculosum* contenant 300.000 spores par centimètre cube est soumise à l'action de doses croissantes d'hypochlorite de sodium. Mélangée, à volumes égaux à la suspension de spores, une solution d'hypochlorite contenant 39 milligrammes de chlore libre par litre, rend impossible la germination des spores.

3° Matière grasse, chlorure de sodium et pH :

Penicillium funiculosum est étudié en comparaison avec deux souches de *Penicillium glaucum* du laboratoire (PG C7 et PG 14) sur les milieux de culture suivants :

- Lactosérum ;
- Lactosérum additionné de 1,5% de chlorure de sodium ;
- Lactosérum additionné de 10% de beurre ;
- Lactosérum additionné de 1,5% de chlorure de sodium et de 10% de beurre.

L'expérience est faite aux températures de 20° et 7° C. dans des séries d'Erlenmeyer de 500 cm³, contenant 50 cm³ des milieux de culture énumérés ci-dessus, amenés aux pH 4, 5, 6 et 7, par addition de solutions normales d'acide lactique ou de lessive de soude.

Les résultats sont consignés dans le tableau II. Pour la clarté de ce tableau, seuls y figurent les résultats obtenus à pH 5, au bout de 30 jours de culture à la température de 20°.

TABLEAU II

Souches utilisées	<i>Penicillium glaucum</i> 14		<i>Penicillium glaucum</i> 7		<i>Penicillium funiculosum</i>	
	Intensité de croissance	Intensité de pigmentation	Intensité de croissance	Intensité de pigmentation	Intensité de croissance	Intensité de pigmentation
Lactosérum	++	—	++	—	+	++
Lactosérum + 1,5% sel	++	—	+++	—	++	++
Lactosérum + 10% beurre . . .	+++	—	+++	—	++++	+++
Lactosérum + 1,5% sel + 10 + beurre	+++	—	+++	—	++++	+++

Résultats obtenus à pH 5, après 30 jours d'incubation à + 20° C.

+	Mauvaise croissance	—	Pas de pigmentation
++	Croissance moyenne	++	Léger brunissement
+++	Bonne croissance	+++	Belle pigmentation violacée
++++	Très bonne croissance		

On peut conclure de ces essais :

a) que l'apport de beurre dans le milieu de culture favorise le développement des trois moisissures considérées ;

b) que le lactosérum additionné de 1,5% de sel et de 10% de beurre, constitue un milieu de culture de choix pour les différentes souches de *Penicillium* étudiées ;

c) que le pH optimum de croissance de *Penicillium funiculosum* est compris entre 4 et 5, tandis que celui de PG 14 est compris entre 5 et 6, et que celui de PG C7 est de 7 ;

d) que seul *Penicillium funiculosum* a provoqué la pigmentation du milieu de culture et que la plus grande intensité de cette pigmentation a été obtenue sur les milieux additionnés de beurre à pH 4 ou 5 ;

e) que *Penicillium funiculosum* se développe dans d'excellentes conditions à 7° et qu'à cette température la valeur optimum du pH de croissance et de pigmentation est de 5.

IV. — DÉVELOPPEMENT COMPARÉ
DE « *PENICILLIUM CANDIDUM* »
ET « *PENICILLIUM FUNICULOSUM* »

Penicillium funiculosum apparaît sur les fromages en fin d'affinage alors que la pigmentation blanche caractéristique de la formation des spores de *Penicillium candidum* apparaît vers le cinquième ou sixième jour de la fabrication. Il était essentiel de déterminer le moment où, par rapport à l'ensemencement de *Penicillium candidum*, *Penicillium funiculosum* s'implante sur les fromages.

L'expérience est faite sur milieu gélosé au caséinate de calcium additionné de beurre, en utilisant une suspension de spores de *Penicillium candidum* et une suspension de spores de *Penicillium funiculosum* dont la concentration en spores est dix fois plus faible que celle de *Penicillium candidum*. Ceci afin de tenir compte du peuplement massif en *Penicillium candidum* que met en œuvre la fabrication des fromages à moisissures superficielles.

Ces suspensions de spores sont ensemencées aseptiquement dans des boîtes de Petri où le milieu de culture a été préalablement réparti. Chaque boîte de Petri reçoit la même quantité de suspensions de spores de *Penicillium candidum* et de *Penicillium funiculosum*, mais les ensemencements des deux suspensions sont effectuées à des temps différents.

La figure 4, où sont consignés les résultats de ces expériences, montre que :

1° *Penicillium funiculosum* occupe complètement le milieu de culture quand il est ensemencé 24 heures avant *Penicillium candidum*. Le milieu de culture prend une teinte violacée.

2° *Penicillium candidum* occupe complètement le milieu de culture quand il est ensemencé 24 heures avant *Penicillium funiculosum*. Le milieu de culture n'est pas teinté.

Entre ces deux cas limites, et en particulier lorsque les deux moisissures sont ensemencées simultanément, elles prennent un développement plus ou moins marqué suivant les cas, et sous le feutrage du *Candidum* apparaissent les taches pigmentées dues à *Penicillium funiculosum*.

Temps de germination de Penicillium funiculosum et de Penicillium candidum :

Une étude comparative des conditions de germination de *Penicillium funiculosum* et de *Penicillium candidum* a montré que :

a) La germination des spores de *Penicillium funiculosum* est plus rapide que celle des spores de *Penicillium candidum* (environ 24 heures de différence) ;

Penicillium funiculosum :

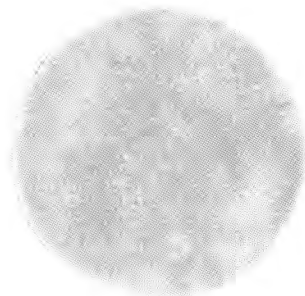
+ 24 heures

+ 12 heures

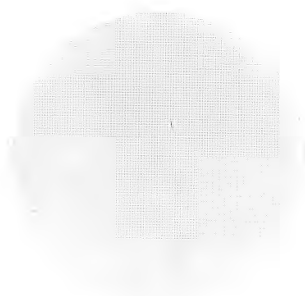
+ 6 heures

0

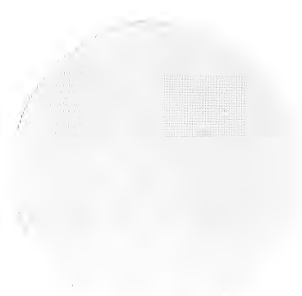
(Face supérieure)



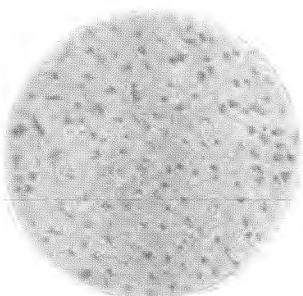
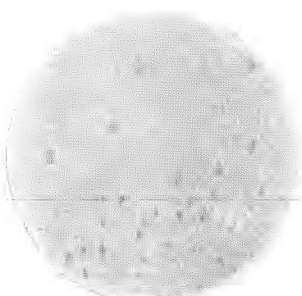
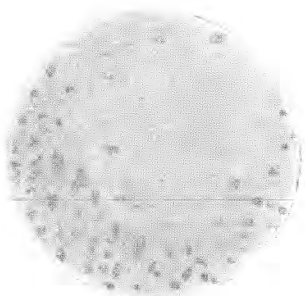
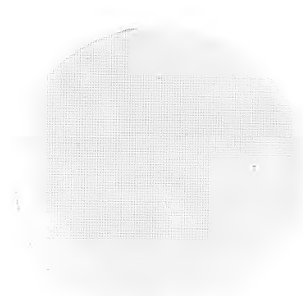
P. funiculosum
occupe toute la surface
du milieu de culture
(tapis violet continu)



Feutrage blanc uni de *P. candidum*.



Nodosités violettes de *P. funiculosum*.



(Face inférieure)

Fig. 4

Développement comparé de *P. candidum* et *P. funiculosum*
selon les époques respectives de leur ensemencement.

Penicillium funiculosum:

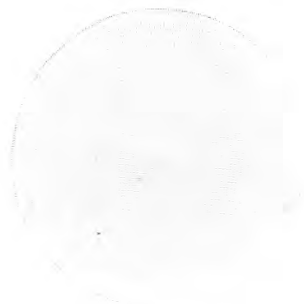
— 6 heures

— 12 heures

— 21 heures

— 24 heures

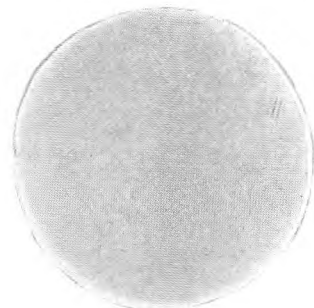
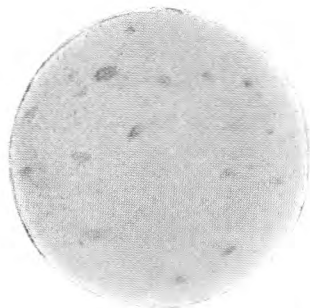
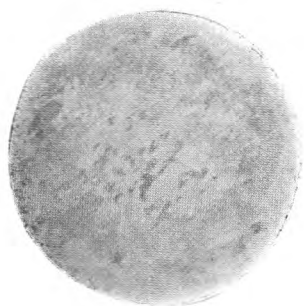
(Face supérieure)



Feutrage blanc uni de *P. candidum*.

Nodosités violettes de *P. funiculosum*.

P. candidum
occupe toute la surface
du milieu de culture
(pas de nodosités violettes).



(Face inférieure)

Fig. 4 (suite)

b) Les filaments mycéliens issus d'une spore de *Penicillium funiculosum* atteignent une longueur de 400 μ en 20 heures environ ; tandis que ceux de *Penicillium candidum* mettent 85 heures pour atteindre la même dimension ;

c) A l'inverse de *Penicillium candidum*, *Penicillium funiculosum* s'accommode de 3 à 5% de sel dans le milieu de culture. *Penicillium funiculosum* ne supporte pas une dose de 13% de chlorure de sodium dans le milieu de culture gras.

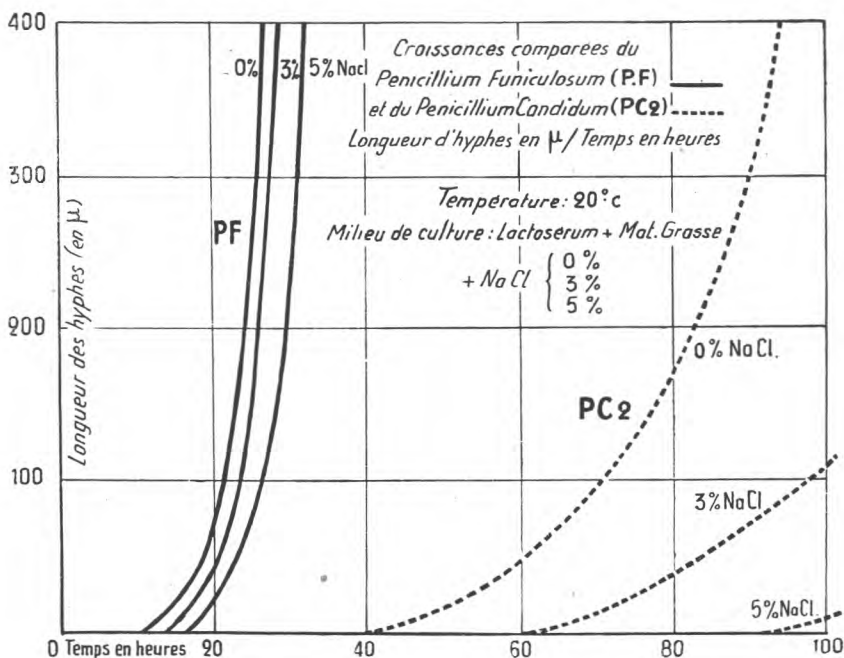


Fig. 5

Le graphique (fig. 5) représente l'évolution comparée du mycélium des *Penicillium* étudiés.

*
* *
*

V. — CONCLUSIONS

En fromagerie, l'origine de l'accident doit donc être cherchée dès le début de la création des surfaces des fromages et non pas au haloir. *Penicillium funiculosum* dont les conditions de vie sont très voisines de *Penicillium candidum*, peut être apporté sur les produits par le lait, par l'eau ou par l'air. C'est l'instant de cet apport, par rapport à celui où *Penicillium candidum* est ensemencé de façon massive

sur les fromages, qu'il faut déterminer avant tout, [pour prévenir la réapparition de l'accident.

LES MÉTHODES DE CONSERVATION DU LAIT DE FEMME (1)

par

R. PIERRET, A. BRETON et B. GAUDIER

Malgré les innombrables modifications que l'on a fait subir au lait de vache pour tenter de l'« humaniser », jamais ses qualités biologiques n'ont pu égaler celles du lait maternel : c'est ainsi qu'aux U.S.A. où l'hygiène est pourtant très développée, de multiples laits ont été successivement utilisés puis abandonnés (MACKINTOSH).

Au bout de quarante années de recherches dans ce domaine de la diététique, il apparaît que le lait de femme reste l'aliment de base du nourrisson normal et sa supériorité sur tout autre demeure incontestable (MELLANDER).

Certes, l'expérience a prouvé que le lait de vache pouvait satisfaire en fait les besoins alimentaires de l'enfant normal.

Mais, dans certains cas, le lait maternel devient un produit indispensable, soit qu'il s'agisse d'un nourrisson débile, convalescent de neuro-toxicose, cachectique ou plus encore d'un prématuré : il acquiert alors une valeur thérapeutique et permet à lui seul de véritables résurrections et une croissance normale (LELONG, ROSSIER et MICHELIN) (cf. aussi circulaire du Ministère de la Santé publique et de la Population en date du 25 novembre 1948 — encourageant la création de lactariums).

« A chaque mammifère, le lait de son espèce » (J. RIBADEAU-DUMAS).

Il est inutile de revenir ici, sur les indications particulières du lait de femme, sur ses modalités d'emploi. Sa supériorité est maintenant admise par la majorité des auteurs, tant pour le nouveau né à terme que pour le prématuré, même si, pour ce dernier, et dans des conditions bien définies, certaines modifications doivent lui être apportées (LELONG, ROSSIER).

Il suffit de rappeler une des premières statistiques réalisées en 1911 à Boston : sur 621 enfants morts de gastro-entérite, 87 seulement étaient nourris au sein. STONE et BAKWIN de leur côté, examinant 26.061 enfants ont démontré que les infections étaient deux fois plus fréquentes chez les nourrissons élevés au lait de vache.

(1) *La Semaine des Hôpitaux, Annales de Pédiatrie*, 1955, 31, 73-7, 405.