

La production d'acide carbonique par les ferments lactiques

par

G. WAES

Station Laitière de l'Etat, Melle (Belgique)

1. Introduction

Galesloot et *al.* [3] signalent que certains ferments lactiques produisent plus rapidement des gaz que d'autres. Cette formation plus rapide de gaz peut être souhaitée dans la fabrication de fromage Gouda, mais ne l'est certainement pas dans la fabrication du Cheddar, où elle provoque le défaut d' « open texture » (fromage trop ouvert). On peut imaginer aussi que la rapidité avec laquelle le citrate fermente pendant et après la fabrication contribue également à déterminer la texture du fromage. Enfin, la formation d'acide carbonique par les ferments lactiques joue aussi un rôle dans la fabrication des fromages pré-emballés et du babeurre.

La production d'acide carbonique peut être déterminée par des méthodes qualitatives et par des méthodes quantitatives. Gibson et *al.* [4], Sandine et *al.* [5], Czulak [2], Crawford [1] et Holmes et *al.* [5] ont décrit des méthodes de détermination qualitative ou semi-quantitative de la production d'acide carbonique, mais ces méthodes ne procurent pas une image exacte du déroulement de la production de CO_2 des ferments dans le lait. Leesment [6] a indiqué une méthode quantitative basée sur les techniques manométriques de Warburg. On partait de 2,5 ml de lait écrémé stérilisé et de 0,5 cm³ d'une suspension des bactéries du ferment. La détermination avait lieu par 30° C et était suivie pendant 2 h. Holmes et *al.* [5] ont déterminé quantitativement la production de CO_2 à l'aide d'un respiromètre différentiel de Gibson. La méthode manométrique directe d'Umbreit [9] a aussi été suivie. Le déroulement de la production de CO_2 a été étudié pendant 6 h 30.

Il nous a semblé intéressant de nous procurer une idée de la rapidité et de l'évolution de la production d'acide carbonique par les ferments dans le lait pasteurisé. La méthode de Leesment [6] nous a semblé convenir moins sous ce rapport, puisqu'on y part d'une suspension bactérienne préparée et que la détermination y a

lieu dans du lait stérile et à une température de 30° C. De plus, le temps de mesure y est limité à 2 h. Une température de 30° C nous semble être trop élevée pour les ferments BD. Chez Holmes et *al.* aussi, la durée de la détermination n'a été que de 6 h 30.

La présente contribution expose les résultats de notre recherche d'une méthode permettant de bien suivre le déroulement de la production de CO₂. Notre attention s'est aussi portée sur l'influence que la durée de l'incubation et la température d'incubation des ferments pouvaient avoir sur leur production de CO₂. L'influence de la conservation des ferments à -20° C et à -30° C sur la production de CO₂ a également été étudiée. Enfin, nous avons examiné quelle influence l'addition de Mn au lait à fermenter exerçait sur la production d'acide carbonique des ferments B.

2. Matériel et méthodes

2.1. Ferments

Les essais décrits ci-après ont été effectués avec 3 ferments BD et 5 ferments B. Les 3 ferments BD étaient une culture de Flora Danica, une culture de Hansen et une culture de Wilken. Les 5 ferments B avaient été fournis par une firme et contrôlés par nous. Les ferments ont toujours été repiqués sur du lait AA chauffé à la vapeur pendant 1/2 h en autoclave ouvert. La quantité repiquée était de 1 p. 100 et l'incubation avait toujours lieu en bain-marie exactement réglé.

2.2. Détermination de l'acide carbonique.

Le gaz carbonique a été déterminé à l'aide de l'appareil Warburg de Braun. Les manomètres utilisés avaient été calibrés à l'usine.

2.3. Conservation des ferments à -20° C et à -30° C

Trois ferments BD ont été utilisés pour ces recherches. Le ferment a été ajouté à raison de 1 p. 100 à du lait AA traité à la vapeur et le tout a été vigoureusement mélangé. Le lait a été transvasé par portions de 100 ml dans des fioles d'Erlenmeyer stériles et placé dans des congélateurs à -20° C et à -30° C. Juste avant l'introduction dans les congélateurs, des portions de laitensemencées chacune d'un des ferments ont incubé pendant 24 h par 20° C, après quoi nous en avons déterminé la production d'acide carbonique. Une portion de chaque ferment conservé à chacune des deux températures a été dégelée au bout de 1, de 2, de 3 et de 5 mois et incubée pendant 24 h par 20° C, la production d'acide carbonique étant déterminée au terme du temps d'incubation. Afin de pouvoir toujours procéder à la détermination en partant du même lait, nous avons utilisé un lait reconstitué à partir d'un même lot de poudre de lait écrémé (solution de 10 p. 100 dans de l'eau distillée).

2.4. *Addition de Mn au lait*

Du Mn était parfois ajouté au lait, à raison de 0,1 p.p.m. et sous forme de $MnSO_4$.

2.5. *Détermination de la nature de la flore bactérienne productrice d'arôme*

La nature de la flore bactérienne productrice d'arôme a été déterminée par la méthode rapide décrite par Galesloot et al. [3].

3. Résultats

3.1. *Méthode*

Le lait contenant des substances tampons, une partie du CO_2 se fixe sous forme de sels, de sorte que seulement une partie de l'acide carbonique réellement produit est mesurée aussi longtemps que le pH n'est pas descendu en dessous de 5. La production de CO_2 ne peut être suivie le mieux possible que si le lait est abondamment ensemencé de ferment, par exemple de 10 p.100, de sorte qu'il arrive rapidement à un pH inférieur à 5.

Les recherches ont démontré que la détermination de l'acide carbonique à l'aide d'un appareil Warburg devait être effectuée en conditions anaérobies. La méthode implique donc l'expulsion par l'azote de l'air présent dans le manomètre et dans le flacon. Si l'on détermine le gaz carbonique dans des conditions aérobies, on obtient des quantités de CO_2 qui ne peuvent plus provenir de la fermentation du citrate. Etant admis que 1 l de lait contient environ 1900 mg d'acide citrique et 1 mol d'acide citrique donnant 2 mol de CO_2 , on peut escompter que la fermentation du citrate dans 1 ml de lait donnera environ 450 μl de CO_2 . Or la méthode aérobie indique des teneurs en CO_2 bien plus élevées.

En conséquence de ces recherches, nous avons finalement appliqué la méthode également utilisée, dans ses grandes lignes, par Stadhouders [8].

La détermination a été effectuée par 25° C à l'aide d'un appareil Warburg. Le ferment à examiner est ajouté, à raison de 10 p.100, à du lait pasteurisé (73° C 20 s) et 1 ml de ce lait ensemencé est introduit dans le flacon du manomètre. Le flacon est fixé au manomètre et l'air contenu dans l'appareil est expulsé par insufflation, durant 1/2 h, d'azote très pur (N 47 Air Liquide). Le liquide contenu dans les deux bras du manomètre est placé aussi haut que possible pendant l'insufflation, ce qui a permis, à la fin de celle-ci, d'entamer l'essai en conditions de sous-pression, la lecture des manomètres devenant ainsi possible pendant une période de 30 h. Les manomètres étaient fermés à la fin de l'insufflation et on notait à ce moment les valeurs qu'ils indiquaient. Chaque détermination de l'acide carbonique a été effectuée au moins en double. Les lectures

avaient lieu toutes les heures pendant les 6 premières heures, puis après 13 h, 24 h et 30 h d'incubation. Afin de vérifier si tout le gaz dégagé était bien du CO_2 , nous avons procédé régulièrement au même essai, mais avec 0,3 ml de KOH à 30 p. 100 dans la coupelle centrale du flacon. Pour le calcul du nombre de μl de CO_2 il a été tenu compte des variations de pression et de température qui se produisaient au cours de la détermination. Deux thermobaromètres ont été utilisés à cette fin. Les manomètres ont été secoués à une fréquence 30 et une amplitude 3 pendant toute la durée de la détermination. La formule $x = h \cdot K \cdot \text{CO}_2$ a été utilisée pour les calculs.

$$K \text{CO}_2 = \frac{Vg \frac{273}{T} + Vf\alpha}{Po}$$

x	représentant	la quantité de gaz en μl (0° C, 760 mm Hg),
h		la modification en mm du bras ouvert du manomètre,
$K \text{CO}_2$		la constante du flacon,
Vf		la quantité, en μl , de liquide dans le flacon,
Vg		la différence, en μl , entre le volume total du manomètre et du flacon et le nombre de μl de liquide du flacon,
T		273 + la température d'opération (25° C),
α		la solubilité du CO_2 dans le lait, en ml CO_2 /ml lait,
Po		la pression standard exprimée en fonction de la solution manométrique.

La valeur α utilisée était la valeur α du CO_2 dans l'eau, qui est de 0,759 à 25° C.

La solution manométrique était la solution connue de Brodie [9] à densité 1,033, de sorte que $Po = 760 \frac{x \ 13,6}{1,033} = 10\ 000$.

De nombreux ferments employés dans la pratique et en laboratoire ont été examinés par cette méthode. Les ferments employés dans la pratique étaient le plus souvent du type produisant rapidement du CO_2 . On peut répartir les ferments en 3 catégories : celle qui dégage très peu de CO_2 , celle qui en dégage lentement et celle qui en dégage très vite. Le tableau 1 donne un exemple de chacune de ces catégories.

3.2. Influence de la durée de l'incubation et de la température d'incubation

Nous avons vérifié si une différence en durée de l'incubation par une température de 20° C ou en température d'incubation pour une durée d'incubation de 20 h exerçait une influence sur le pouvoir

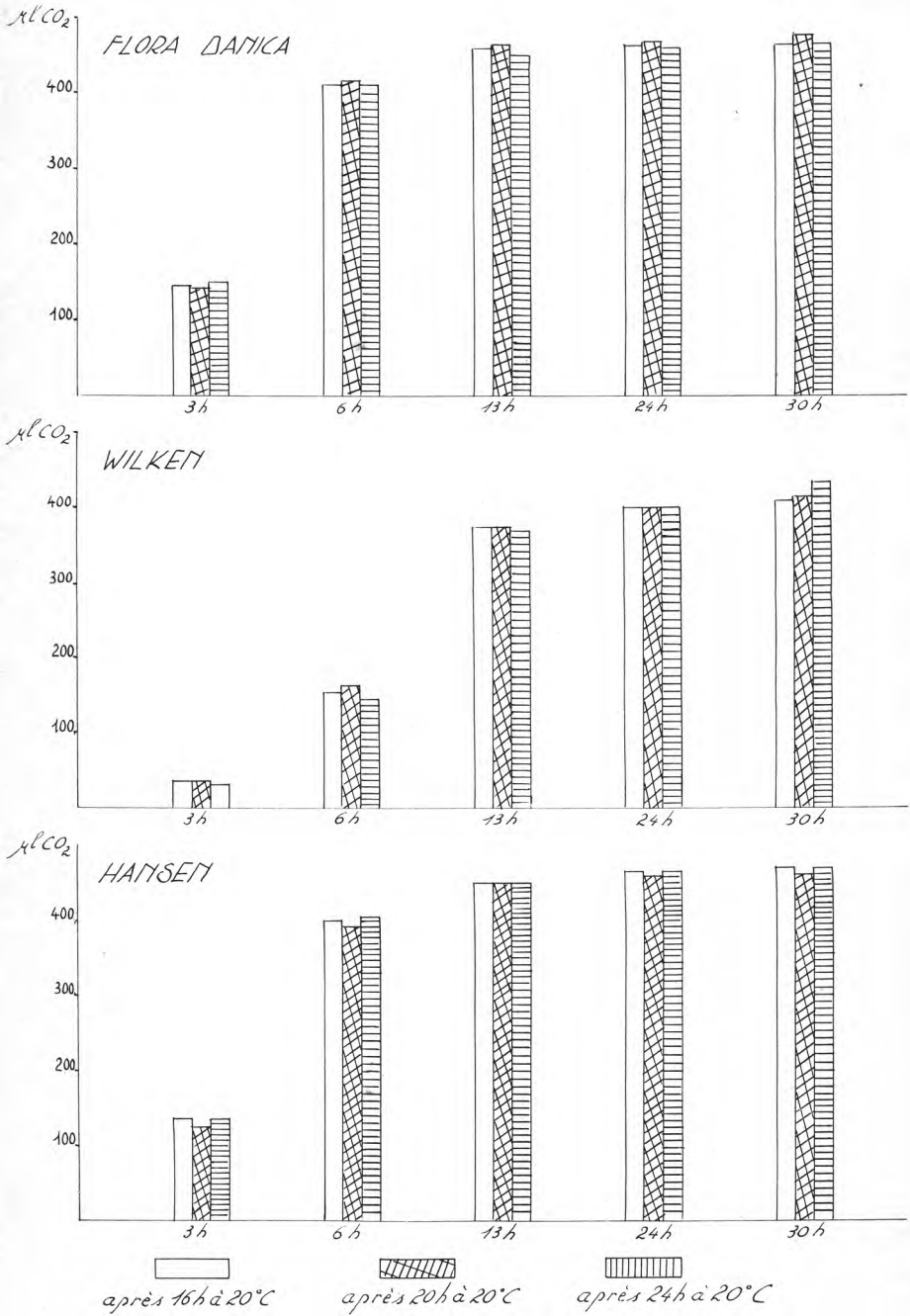


fig 1

Production moyenne d'acide carbonique de 3 ferments BD incubés de 16 à 24 h à 20° C

de formation de gaz carbonique de 3 ferments BD dans du lait pasteurisé (73° C pendant 20 s).

3.2.1. *Influence de la durée de l'incubation*

Chacun des 3 ferments BD a été repiqué pendant 14 j, la durée d'incubation étant de 16, de 20 ou de 24 h par une température de 20° C. Nous avons vérifié sur ces cultures si de tels écarts en durée d'incubation influaient sur la production d'acide carbonique des ferments dans du lait pasteurisé. La figure 1 reproduit les productions moyennes de gaz carbonique relevées, lors des essais de Warburg, respectivement 3, 6, 13, 24 et 30 h après le début des essais. Ces essais ont été effectués quatre fois avec le Flora Danica et avec le Hansen et sept fois avec le Wilken. Les trois graphiques distincts, qui se rapportent chacun à un des 3 ferments BD, montrent qu'une variation de 16 à 24 h de la durée de l'incubation à 20° C n'a pas eu d'influence notable sur la production d'acide carbonique.

3.2.2. *Influence de la température d'incubation*

Ces recherches ont porté sur 3 ferments BD. La durée de l'incubation a été de 20 h, chaque culture étant incubée à 20, à 25 et à 30° C. Avant de procéder à la détermination de la production d'acide carbonique, nous avons repiqué les cultures pendant 7 j, puis examiné par la méthode de Galesloot [3] la composition de la flore en bactéries productrices d'arôme. Les cultures incubées à 20 et à 25° C étaient demeurées des ferments BD tandis que celles incubées à 30° C s'étaient transformées en ferments D.

Nous avons examiné ensuite si une telle différence en température d'incubation influait sur le pouvoir de formation d'acide carbonique des ferments dans le lait pasteurisé. La figure 2 reproduit les productions moyennes d'acide carbonique relevées, lors des essais de Warburg, respectivement 3, 6, 13, 24 et 30 h après le début des essais. Ces essais ont été effectués deux fois avec les ferments Flora Danica et Hansen et quatre fois avec Wilken.

La figure montre clairement que la variation de 20 à 30° C de la température d'incubation n'avait pratiquement aucune influence sur l'ampleur de la production d'acide carbonique au bout de 30 h dans le cas des ferments Hansen et Wilken. Il semble toutefois que cette production débutait plus rapidement quand ces cultures étaient incubées par 30° C. Dans le cas du ferment Wilken, la production moyenne d'acide carbonique 3 h après le début de l'essai était de 111 µl pour la culture par 30° C contre 48 µl pour celle par 25° C et 70 µl pour celle par 20° C. Les productions d'acide carbonique étaient pratiquement égalisées 13 h après le début des essais.

Le ferment Flora Danica s'est comporté tout différemment. Incubé à 30° C, ce ferment a produit une culture dont la production de CO₂ était nettement plus lente et, après 30 h, nettement inférieure à celle du même ferment incubé à 20° C ou à 25° C. Trente h après le

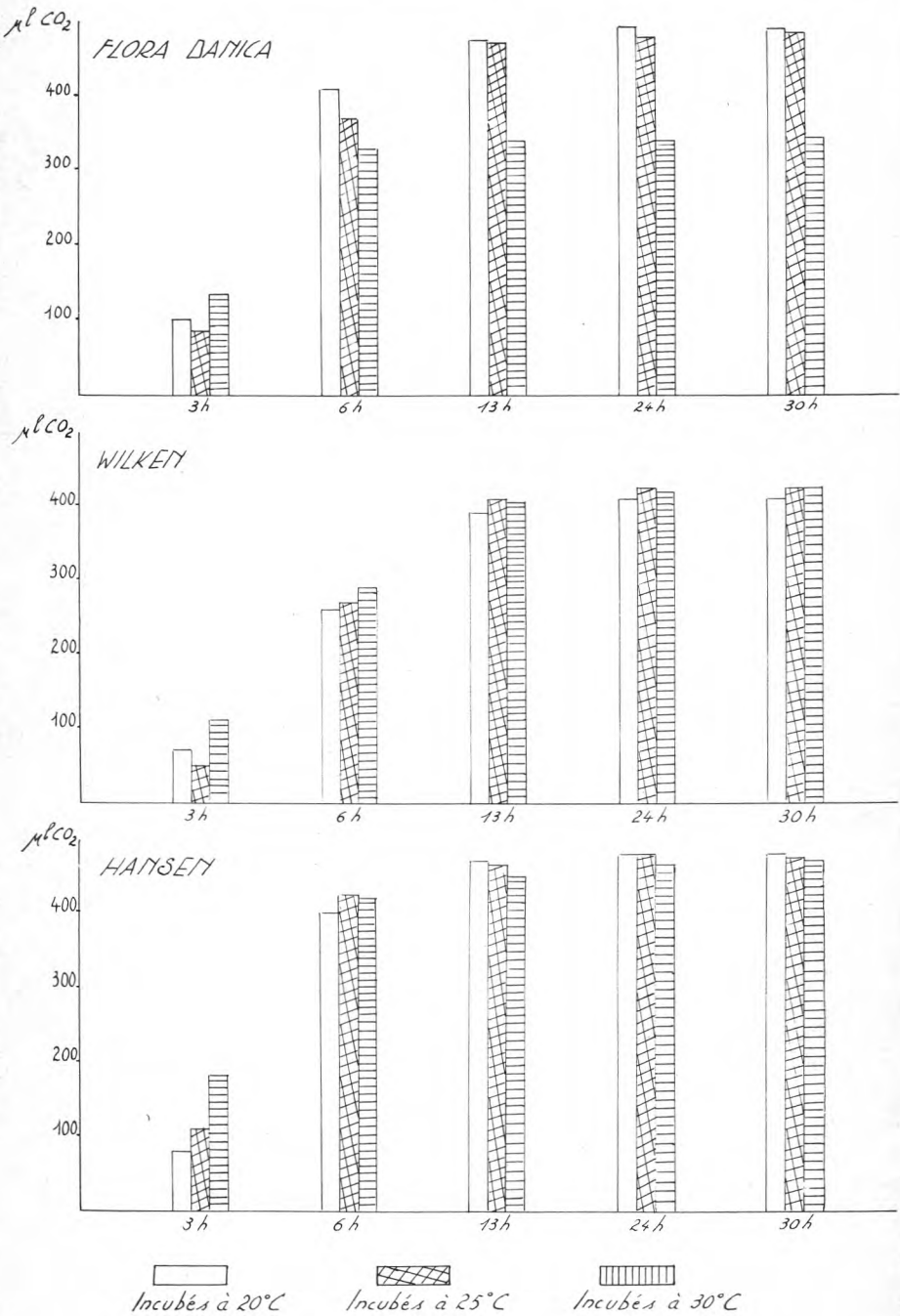


fig. 2

Production moyenne d'acide carbonique de 3 ferments BD incubés pendant 20 h par 20 à 30° C

début de l'essai, la production de gaz carbonique du ferment Flora Danica cultivé par 30° C n'atteignait que 345 µl contre 483 µl pour les cultures par 25° C et 488 µl pour celles par 20° C.

On peut dire que, considérée globalement, l'influence de température d'incubation sur la production d'acide carbonique est fonction du ferment.

TABLEAU 1

Production de gaz carbonique de trois types de ferment

Type de ferment	Production de gaz carbonique, en µl/ml, en					
	1 h	3 h	6 h	13 h	24 h	30 h
Ferment O (très lent)	1	8	20	52	74	81
Ferment B (lent)	6	41	104	294	330	346
Ferment BD (rapide) .	21	147	442	457	469	472

3.3. Influence de la conservation par — 20° C et par — 30° C

La conservation à basse température des ferments lactiques est une technique connue. Le lecteur trouvera plus de détails à son sujet chez Waes [10]. Nous avons examiné si la conservation par — 20° C et par — 30° C de 3 ferments BD pouvait influencer sur les productions d'acide carbonique de ces ferments.

Le tableau 2 présente les résultats obtenus sous le rapport de la production d'acide carbonique avec 3 ferments BD conservés pendant 0, 1, 2, 3 et 5 mois par — 20° C et par — 30° C. Les productions y sont indiquées en µlCO₂ mesurés 1, 3, 6, 13, 24 et 30 h après le début de l'essai. Ces résultats indiquent que 5 mois de conservation des ferments n'influaient pas sensiblement sur le déroulement de la production d'acide carbonique.

3.4. Influence de l'addition de Mn

Cinq ferments B ont été cultivés pendant 14 j dans du lait additionné de Mn et dans du lait non additionné de Mn. La production d'acide carbonique de ces deux séries de cultures, avec Mn et sans Mn, a ensuite été déterminée dans du lait pasteurisé (73° C pendant 20 s). Les résultats de ces déterminations sont reproduits au tableau 3. Les déterminations ont été effectuées aussi bien au printemps qu'en été. Les résultats indiquent que l'addition de Mn au lait à fermenter exerçait une influence nettement stimulante sur la rapidité de la production d'acide carbonique et ceci aussi bien dans le lait de printemps que dans le lait d'été.

TABLEAU 2

Influence de la conservation à -20°C et à -30°C sur la production d'acide carbonique de 3 ferments BD

Ferment	Durée de conservation en mois	Conservation à -20°C						Conservation à -30°C					
		Production d'acide carbonique, en $\mu\text{l/ml}$ au bout de						Production d'acide carbonique, en $\mu\text{l/ml}$ au bout de					
		1 h	3 h	6 h	13 h	24 h	30 h	1 h	3 h	6 h	13 h	24 h	30 h
Flora Danica	0	18	117	383	440	444	470						
	1	13	162	398	462	462	473	16	143	408	454	470	479
	2	20	153	396	463	470	476	10	94	383	452	469	477
	3	19	109	372	453	463	474	18	110	402	444	458	464
	5	40	175	409	462	477	491	28	111	409	457	476	479
Wilken	0	16	121	397	445	459	455						
	1	25	213	396	454	466	473	15	161	416	448	458	463
	2	17	137	387	462	474	476	15	131	407	457	471	471
	3	16	117	359	475	485	488	21	136	410	453	468	469
	5	38	163	420	468	479	491	19	106	386	450	474	476
Hansen	0	18	132	381	462	475	473						
	1	18	196	424	464	476	484	11	122	309	447	461	473
	2	26	212	418	463	470	486	11	94	373	453	464	466
	3	35	208	423	459	480	483	25	149	424	438	455	466
	5	44	199	403	437	452	470	31	171	423	450	479	487

TABLEAU 3

Influence exercée par l'addition de Mn au lait à fermenter sur la production d'acide carbonique de 5 ferments B

Ferment	Saison	Production d'acide carbonique, en $\mu\text{l/ml}$ au bout de						Production d'acide carbonique, en $\mu\text{l/ml}$ au bout de					
		Lait à fermenter additionné de Mn						Lait à fermenter non additionné de Mn					
		1 h	3 h	6 h	13 h	24 h	30 h	1 h	3 h	6 h	13 h	24 h	30 h
1	P	1	15	93	320	349	360	0	0	21	231	369	384
	E	6	33	116	326	341	350	1	1	22	228	358	369
2	P	7	41	196	370	433	451	0	14	87	373	379	382
	E	8	55	229	414	445	450	1	14	97	376	442	461
3	E	11	59	209	314	314	332	0	7	46	318	343	344
4	E	5	32	148	317	326	333	3	10	26	108	354	405
5	E	2	12	68	317	342	348	0	5	43	176	224	218

Légende : P = printemps ; E = été.

4. Commentaires et conclusions

La méthode appliquée permet de se former une bonne idée de la production d'acide carbonique par les ferments lactiques. Elle fournit, par conséquent, un moyen de sélectionner le ferment lactique qui semble convenir le mieux, sous le rapport technologique, à la fabrication de certains produits laitiers. Le babeurre nécessite un ferment à pas trop grande capacité de production d'acide carbonique. Un ferment de ce genre semble aussi indiqué pour la fabrication de fromage Cheddar et de fromage préemballé. La détermination rendra certainement aussi des services quand le fromage Gouda pose des problèmes de texture. Des recherches ultérieures devront élucider en quelle mesure la production d'acide carbonique du ferment, déterminée par cette méthode, correspond à la texture des fromages. Des travaux effectués aux fins d'orientation à la Station Laitière de l'Etat ont déjà indiqué que l'emploi de ferments à très faible ou à très rapide production d'acide carbonique entraîne de nettes différences en texture du fromage Gouda et en qualité du fromage pré-emballé. Il découle aussi des recherches que, pour une température d'incubation de 20° C, une variation de 16 à 24 h de la durée de l'incubation n'a pas influé sensiblement sur la production d'acide carbonique. On peut donc poser que cette production est assez stable. Une influence sur la production de gaz carbonique a cependant été constatée parfois quand on faisait varier la température d'incubation de 20 à 30° C. Ceci n'est pas bien étonnant, des températures aussi différentes pouvant entraîner d'importantes modifications de la flore bactérienne productrice d'arôme. Avec la technique utilisée pour conserver des ferments par — 20 et par — 30° C, aucune influence notable sur la production du gaz carbonique n'a été observée au bout de 5 mois. Il découle de recherches publiées ailleurs [10] qu'avec la méthode employée une conservation d'une durée de 4 mois et par — 20 et par — 30° C est aussi permise en ce qui concerne l'activité et la flore bactérienne productrice d'arôme. Galesloot *et al.* [3] ont signalé que l'addition de Mn au lait favorise le développement de *leuconostoc*. Il découle de nos recherches que l'addition de Mn au lait à fermenter exerçait aussi bien au printemps qu'en été une influence nettement stimulante sur la production d'acide carbonique dans les ferments B.

Résumé

L'article décrit une méthode de détermination de la production d'acide carbonique des ferments lactiques. Les recherches ont démontré que les ferments doivent être répartis en 3 catégories : ceux qui forment peu de CO₂, ceux qui en forment lentement et ceux qui en forment très rapidement.

Il est apparu en outre qu'à une température d'incubation de 20° C, une variation de 16 à 24 h de la durée de l'incubation n'exerçait aucune influence notable sur la production d'acide carbonique de 3 ferments BD. Une influence sur la production d'acide carbonique de ces 3 ferments BD a toutefois été constatée parfois quand on faisait varier la température d'incubation de 20 à 30° C. Aucune influence notable sur la production d'acide carbonique n'a été observée après 5 mois de conservation des ferments à — 20 et à — 30° C par la technique utilisée.

Summary

In this publication a method is described for determining the carbon dioxide production in starters. Research has shown that starters can be divided into three categories, those which produce little CO₂, those which produce CO₂ slowly and those which produce CO₂ very quickly. Furthermore, it has appeared that at an incubation temperature of 20° C a variation from 16 h to 24 h had no noticeable influence on CO₂ production of three BD starters.

By allowing the temperature to vary from 20° C to 30° C an influence on the CO₂ production of the 3 BD starters was indeed sometimes established. With the technique used to preserve starters at — 20° C and — 30° C no noticeable influence was observed on the CO₂ production after five months.

Bibliographie

- [1] CRAWFORD (R. J. M.) (1962). — Citrate utilizing activity of certain starter bacteria. *XVI International Dairy Congress, Section III*, 2, 322.
- [2] CZULAK (J.) (1953). — *Streptococcus diacetilactis* in starters for Cheddar cheese. *Aust. J. appl. Sci.*, 4, 462.
- [3] GALESLOOT (Th. E.) en HASSING (F.) (1961). — Enkele verschillen in gedrag tussen zuursels met als aromabakterie *S. diacetilactis* of *B. cremoris*. *Neth. Milk Dairy J.*, 15, 225.
- [4] GIBSON (T) and ABDEL-MALEK (Y.) (1946). — The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.*, 14, 35.
- [5] HOLMES (B.) SANDINI (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1968). — Some factors influencing carbon dioxide production by *Leuconostoc citrovorum*. *Appl. Microbiology*, 16, 56.
- [6] LEESMENT (H.) (1967). — Bestämning av gasbildningsförmögan hos syrningskulturer. *Svenska Mejeritidn*, 34, 469.
- [7] SANDINE (W. E.), ELLIKER (G. R.), WILSTER (G. H.) STEIN (R. L.) and ANDERSON (A. W.) (1957). — A beaker test for estimating gas-producing tendency of lactic acid-starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 40, 1646.
- [8] STADHOUDERS (J.). — Communication personnelle.
- [9] UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) and STAUFFER (J. F.) (1951). — Manometric techniques and tissue Metabolism Burgers publishing co.
- [10] WAES (G.) (1970). — Bewaren van BD zuursels bij — 20° C, — 30° C en — 196° C. *Landbouwtijdschrift*, 23, 1089.

Reçu pour publication en novembre 1970.