

Etude du rôle des micro-organismes et de leurs enzymes dans la maturation des fromages

I. — FABRICATION ASEPTIQUE D'UN CAILLE MODELE

par

D. LEBARS, M. J. DESMAZEAUD, J. C. GRIPON
et J. L. BERGERE

*Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Biochimie Microbienne, C.N.R.Z.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

Les premières phases de la fabrication des fromages (coagulation du lait, égouttage et mise en forme du caillé...) sont maintenant parfaitement maîtrisées et permettent d'obtenir des produits présentant des caractéristiques bien définies et constantes.

Il n'en est pas de même de l'affinage, phénomène complexe, et dont la conduite est encore essentiellement à base d'empirisme non seulement dans les fabrications artisanales de fromages traditionnels mais aussi dans les unités importantes très industrialisées.

La maturation des fromages est commandée par le développement et l'activité des micro-organismes, c'est-à-dire non seulement par l'espèce et le nombre de ces micro-organismes mais aussi par la nature et la quantité d'enzymes qu'ils élaborent et par l'action de ces enzymes sur les constituants du fromage.

Dans ce domaine les connaissances accumulées jusqu'à maintenant portent surtout sur le processus global c'est-à-dire sur les transformations des constituants du fromage sous l'action de l'ensemble des micro-organismes qu'il contient, ce qui représente un nombre encore plus grand d'enzymes et le plus souvent uniquement sur le résultat de ces transformations.

Par ailleurs on commence à connaître l'équipement enzymatique de quelques-uns des micro-organismes se développant dans les fromages et les propriétés de certaines des enzymes qui les constituent. Mais, par contre on manque de données sur la part respective de ces micro-organismes dans l'affinage du fromage et surtout sur le

rôle de leurs enzymes dans le phénomène de la maturation : nature, mode d'action dans le caillé, importance relative etc., c'est le cas en particulier pour les enzymes protéolytiques responsables d'un ensemble de transformations, les plus profondes que subit le caillé au cours de l'affinage.

La seule façon de comprendre ce phénomène c'est d'étudier séparément l'action de chaque espèce ou groupe de micro-organismes susceptible de jouer un rôle dans la maturation et encore mieux celle de leurs enzymes, en particulier celles qui ont déjà été étudiées au laboratoire.

Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un caillé modèle si possible dépourvu de micro-organismes vivants susceptibles d'avoir une activité enzymatique, à l'exception de ceux que l'on désire éventuellement étudier.

Dans cette optique quelques travaux ont déjà été effectués. Ils concernent l'étude de l'action protéolytique des bactéries lactiques dans du caillé aseptique (Ohmiya et Sato, 1970 a et b) ou dans le cas du Cheddar des études d'arôme sur des fromages à flore contrôlée (Mabbitt et *al.*, 1955 ; Perry et Mc Gillivray, 1964 ; Reiter et *al.*, 1969) et plus récemment l'étude de l'importance relative de la présure, de la pepsine et des bactéries lactiques dans la maturation (Foster et Green, 1974).

Le présent travail décrit la fabrication aseptique d'un caillé modèle à flore contrôlée destiné avant tout à servir de matériel pour des études générales sur la maturation, sans chercher à reproduire à priori un type déterminé de fromage.

Ce caillé dans lequel l'acidification est provoquée artificiellement par hydrolyse de la gluconolactone — selon Mabbitt et *al.* (1955) — est préparé à partir de lait ayant subi un traitement U.H.T.

MATERIEL ET METHODES

1) Préparation du lait

Le taux en matière grasse du lait est ajusté par écrémage selon la teneur souhaitée dans le fromage.

Après addition ou non de nisine (solution à 1 g pour 100 ml d'eau distillée de Nisaplin 10⁶ UI/g) comme il est indiqué dans les résultats, le lait subit un traitement thermique par injection de vapeur dans une installation U.H.T. pilote Laguillarre (Cerf et Hermier, 1973). Le lait refroidi à 20° C-25° C est ensuite recueilli dans un tank stérile avant d'être admis dans la salle de fabrication par l'intermédiaire d'une canalisation en acier inoxydable munie de vannes aux deux extrémités. L'installation de traitement U.H.T., le tank et la canalisation d'arrivée du lait sont stérilisés en même temps par circulation de

vapeur saturante à 130° C pendant 1 h. Le tank et la canalisation sont ensuite remplis d'air stérilisé par filtration sur membrane (Selas-Flotronics FM 90-0,2 μm) et maintenu sous une pression de 1 bar qui permet d'éviter toute recontamination d'origine externe et ensuite de pousser le lait vers la salle de fabrication (fig. 1).

2) Fabrication du caillé (ou des fromages)

a) Produits ajoutés au lait ou dans le caillé

La présure (Boll) au 1/10 000 est diluée au 1/2 dans de l'eau distillée puis stérilisée par passage sur filtre Seitz sous une pression de 1 bar. Les antibiotiques, streptomycine sulfate et pénicilline (injectables S.P.E.C.I.A.) ou tylosine base (Milly and Co) sont dissous aseptiquement dans de l'eau distillée stérile. La gluconolactone ajoutée directement sous forme de cristaux est pesée et manipulée aseptiquement.

b) Conditions aseptiques de fabrication

Toutes les opérations concernant la fabrication des fromages sont effectuées dans une chambre blanche (5 \times 3 m) munie d'un sas d'entrée. De l'air est constamment insufflé dans cette pièce par un conditionneur d'air (Airwell médical type « Bactériologique ») équipé d'un filtre fibreux à haute efficacité (pouvoir d'arrêt : 99,97 p. 100 des particules de diamètre supérieur à 0,3 μm) et de batteries chaude et froide qui permettent de régler la température de la salle. Grâce à cette admission d'air et à un système de clapets anti-retour l'atmosphère de la salle est toujours en surpression (1,5 mm d'eau) par rapport à celle du sas, elle-même en surpression par rapport à l'ambiance extérieure.

Avant chaque fabrication on répète les opérations suivantes. Les surfaces de travail et le sol de la salle du sas sont rincés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 p. 100 dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. Le petit matériel qui sera utilisé au cours de la fabrication (récipients, louche, tranche caillé, moules, etc.) est enveloppé dans du papier, puis stérilisé dans un autoclave automatique (cycle initial à balayage de vapeur sous vide partiel, stérilisation à 127° C, pendant 30 mn, et séchage final), puis placé dans la pièce sans être déballé, de même que les additifs (§ a) qui ont été conditionnés dans des flacons stériles étanches.

Les vêtements du manipulateur (blouse, bonnet, masque, bottes de tissu, gants de latex...) stérilisés de la même façon que le matériel sont placés dans le sas.

La ventilation ayant été arrêtée, la pièce et le sas sont ensuite stérilisés en vaporisant 1 500 ml de formaldéhyde à 26 p. 100 à l'aide d'un chauffe-ballon. Après 16 h de contact la ventilation de la pièce est rétablie pour éliminer le formol et maintenir l'atmosphère en

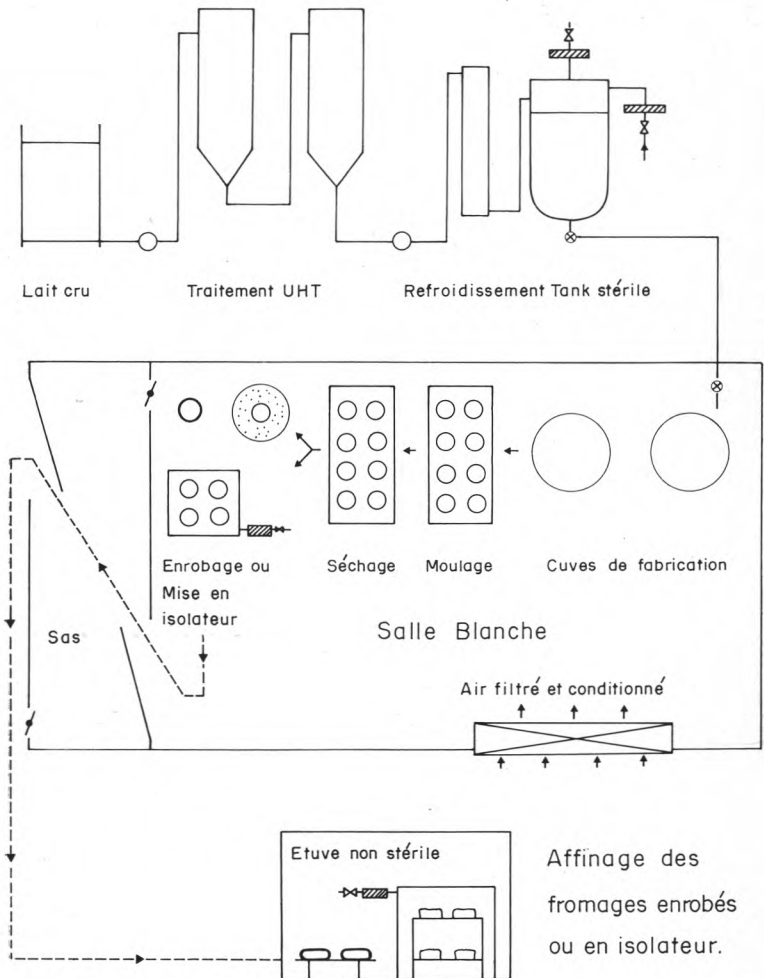


fig. 1

Conditions aseptiques de fabrication et d'affinage du caillé modèle

légère surpression. Au bout de quelques heures le manipulateur peut alors pénétrer dans la chambre stérile, après avoir revêtu les vêtements stériles placés dans le sas.

c) Matériel de fabrication

Juste avant la fabrication le manipulateur déballe le matériel de fabrication stérile dont deux bassines en acier inoxydable de 15 l

dans chacune desquelles 10 l de lait sont soutirés puis réchauffés. La coagulation, le découpage et le brassage manuel sont effectués dans ces récipients. Le caillé est ensuite déposé dans douze moules de 6 cm de diamètre par l'intermédiaire d'un répartiteur multimoule. Après égouttage les fromages sont salés dans une saumure saturée en sel préalablement stérilisée à 120° C pendant 20 mn.

Le processus de fabrication proprement dit est décrit dans les résultats. Toutes les opérations sont effectuées dans la salle blanche dont la température ambiante est de 30° C.

3) Conditions d'affinage

La préparation des fromages pour l'affinage s'effectue également dans des conditions aseptiques à l'intérieur de la salle blanche.

Deux techniques ont été utilisées. La première consiste à enrober chaque fromage dans de la cire fondue préalablement stérilisée par autoclavage, cette cire est celle couramment utilisée pour les fromages à pâte pressée de type hollandaise.

La deuxième technique a été prévue pour affiner des fromages à flore superficielle. Ceux-ci sont placés dans un isolateur constitué d'un sac en polyéthylène autoclavable de 60 × 78 cm. Ce sac dont l'ouverture a été soudée contient un portoir en acier inoxydable et comporte une ouverture sur laquelle est adapté un filtre constitué de coton de verre qui permet de renouveler stérilement l'atmosphère de l'isolateur en cours d'affinage.

L'ensemble est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20 mn et placé dans la salle blanche avant la stérilisation au formol. Au moment de l'utilisation, le sac est ouvert sur un côté pour introduire les fromages (quatre par isolateur), puis ressoudé.

Les fromages emballés dans la cire ou dans les isolateurs qui les contiennent sont ensuite placés sans condition d'asepsie dans une étuve ou un haloir normal réglé à la température choisie pour l'affinage. Au cours de celui-ci les fromages destinés à l'analyse sont prélevés aseptiquement à partir des isolateurs, soit sous une hotte à flux laminaire, soit en isolant un fromage dans un coin du sac qui est ensuite soudé et coupé.

4) Analyses

Les dénombrements des micro-organismes présents dans le lait, les sérums ou les fromages ont été effectués sur Plate Count Agar (Difco) pour la flore totale et sur milieu de Wang et *al.* (1964) après chauffage à 80° C pendant 15 mn pour les spores. Dans le cas des fromages, un secteur de 10 g est pesé puis broyé aseptiquement en présence d'une solution stérile de citrate de sodium à 2 p. 100 en eau distillée. Cette suspension chauffée ou non sert ensuite à inoculer le milieu de culture.

La détermination de l'extrait sec total des fromages a été effectuée par dessiccation à l'étuve à 105° C et celle de la matière grasse par la méthode Van Gulick.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1) Traitement du lait de fabrication

Etant donné le but poursuivi, en particulier l'étude de l'action d'enzymes dans le fromage en absence de levains lactiques, il est indispensable de préparer un caillé qui ne contienne pas de micro-organismes vivants ou seulement un nombre très faible, mais qui ne soient pas capables de se multiplier au cours d'une période d'au moins 1 à 2 mois, correspondant à la durée d'affinage d'un fromage courant. Ceci suppose que non seulement la fabrication soit effectuée dans des conditions aseptiques mais aussi que le lait n'apporte pas de micro-organismes capables de se multiplier ultérieurement.

La traite aseptique qui peut permettre de recueillir un lait pratiquement stérile ou en tout cas très faiblement contaminé (Perry et Mc Gillivray, 1964) a été écartée parce qu'elle pose trop de problèmes pour la récolte des quantités de lait nécessaires, de 30 à 250 l pour des essais plus importants que ceux réalisés ci-après.

L'utilisation du traitement H₂O₂-catalase utilisé par Ohmiya et Sato (1970 a) n'a pas non plus été retenu ; comme on pouvait s'y attendre, il ne détruit que partiellement la flore présente dans le lait, de 95 p. 100 à 99 p. 100 et surtout n'a absolument pas d'effet sur les spores bactériennes (Pulay et Toth, 1964), pour détruire celles-ci il faut en particulier des concentrations en H₂O₂ bien plus importantes que celles utilisables dans du lait de fromagerie (Cerf et Hermier, 1972).

Le traitement thermique dans un appareil U.H.T. a été choisi parce qu'il peut permettre d'obtenir du lait stérile pour des températures de l'ordre de 145° C. Toutefois bien que ce type de traitement ne dénature que modérément les constituants du lait, il ne permet pas de fabriquer normalement du fromage au moins dans l'état actuel de nos connaissances. Après des essais de fabrication effectués avec du lait chauffé par ce procédé à 140° C, 130° C, 120° C et 110° C, cette dernière température a été retenue. En effet elle permet de fabriquer un fromage normal à condition d'ajouter du chlorure de calcium et sans trop modifier la technologie fromagère (§ 3).

Le lait utilisé au cours de nos essais contenait au maximum 50 000 germes totaux et 1 000 spores par ml. Après traitement à 110° C il contenait moins de 10 bactéries par ml uniquement sous forme de spores. Dans des fromages fabriqués à partir de ce lait en absence de levains lactiques selon la méthode décrite au

TABLEAU 1

Influence de l'addition d'antibiotiques sur le développement microbien dans les fromages

Durée d'incubation des caillés à 30° C (en jours)	O	Antibiotiques ajoutés au lait				
		T-10	T-100	N-100	N-100 P 1,2 S 1,2	N-100 P 12 S 12
2-3	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—
6		+	—	—	—	—
12			+	— ou +	— ou +	—
18				— ou +	— ou +	—
30				— ou +	— ou +	—
60 à 75						—

N : nisine et P : pénicilline G en U.I./ml ; T : tylosine et S : streptomycine sulfate en ppm.

Le signe + correspond à la présence d'au moins une colonie par boîte de Petri contenant du milieu de Wang ou du PCA ensemencé avec 0,1 ml d'une suspension de fromage à 10 p. 100 ou de la petite quantité de sérum d'exudation du caillé qui est retenu par l'enveloppe de cire. Le développement est généralement tel qu'on peut également l'observer par un examen microscopique direct du sérum ou de la suspension de fromage.

§ 3, un développement de *Bacillus* commence à se manifester à partir du 4^e jour après la fabrication lorsque la température d'incubation est de 30° C (tab. 1) et à partir de 8 à 15 j à 12° C. Par contre ce développement est complètement inhibé, si on utilise un levain lactique au lieu de gluconolactone.

2) Addition d'antibiotiques et influence sur la stabilité des fromages

La présence de quelques spores de *Bacillus* dans le caillé modèle n'est pas gênante à condition qu'elles ne soient pas à l'origine d'un développement cellulaire plus important. Pour tenter d'inhiber leur développement, l'addition au lait d'antibiotiques alimentaires nisine

et tylosine et d'autres, pénicilline et streptomycine, a été utilisée en incubant le caillé modèle à 30° C pour se placer dans les conditions les plus favorables au développement des *Bacillus* (tab. 1). La nisine est ajoutée au lait avant traitement thermique en raison de son action adjuvante à celle du chauffage, les autres immédiatement avant fabrication en même temps que la présure.

La tylosine même à une concentration de 100 ppm ne permet pas de conserver des fromages exempts de développement microbien au-delà de 12 jours d'incubation et communique de plus un goût amer au fromage. On a d'ailleurs constaté au cours d'essais préliminaires que le lait de fabrication lui-même simplement additionné de tylosine à 100 ppm et incubé à 30° C se conservait mieux que le lait contenant la même quantité de tylosine avec en plus de la présure et de la gluconolactone aux concentrations utilisées pour la fabrication. La nisine à 100 ppm (100 UI/ml) seule ou en association avec la pénicilline (1,2 UI/ml) et la streptomycine (1,2 ppm) comme l'ont utilisée Reiter et *al.* (1967) sont généralement suffisantes pour empêcher tout développement de *Bacillus* pendant une période d'incubation d'au moins 1 mois sauf dans quelques cas (tab. 1). L'association nisine à 100 UI/ml, pénicilline 12 UI/ml et streptomycine à 12 ppm qui donne les résultats les plus constants a été retenue et utilisée régulièrement par la suite.

3) Technique de fabrication des fromages

Le schéma des différentes opérations du processus de fabrication est représenté dans le tableau 2. L'utilisation de lait chauffé et l'absence de levain lactique ne permettent pas de fabriquer un fromage selon les procédés classiques. L'influence néfaste du chauffage sur la coagulation du lait et le durcissement du caillé a été palliée par l'apport de chlorure de calcium, l'augmentation de la quantité de présure et de la température de coagulation. Grâce à ces artifices, la coagulation est normale et le caillé suffisamment ferme pour être découpé et moulé sans difficulté après un pressage modéré. Le manque d'acidification naturelle est résolu par l'apport d'un composé qui s'hydrolyse spontanément en acide gluconique, la gluconolactone selon la technique préconisée par Mabbitt et *al.* (1955) à la différence toutefois que le lait n'a pas été acidifié avant coagulation. En effet on a constaté que du lait dont le pH est ajusté à 6,0 ou au-dessous avec de la gluconolactone donne un caillé friable et difficile à manipuler en raison de sa fragilité, ceci est vraisemblablement dû au traitement thermique subi par le lait. Cependant grâce à la technologie suivie et à l'apport fractionné de la gluconolactone au cours de la fabrication qui permet une acidification progressive, la synérèse du caillé s'effectue normalement et le produit obtenu après moulage présente des caractéristiques tout à fait acceptables.

TABLEAU 2. — Schéma de fabrication du caillé modèle

Temps	Opérations
—	Traitement U.H.T. à 110° C du lait + Nisine, 100 UI/ml.
0	Addition au lait (10 l) réchauffé à 45° C de : — pénicilline 12 UI/ml et streptomycine 12 ppm, — 100 ml d'une solution de CaCl ₂ à 10 p. 100 en eau, — 10 ml de présure au 1/5 000. Prise du lait en 3 mn et coagulation en 30 mn.
30 mn	Découpage vertical à la lame puis brassage lent à la louche (caillé en morceaux de 4 × 4 cm environ).
45 mn	Découpage lent au tranche caillé à fil (caillé en fragments de la taille d'un « grain de maïs »). Addition en « pluie » de 20 g de gluconolactone en agitant doucement le caillé à la louche. Léger brassage répété toutes les 5 mn.
1 h 15 mn	Repos du caillé pendant 5 mn puis élimination d'environ 5 l de sérum. Addition en « pluie » de 80 g de gluconolactone en remuant le caillé à l'aide d'une spatule.
1 h 27 mn	Moulage du caillé au répartiteur multimoule (12 moules de 6 cm de Ø).
1 h 30 mn	Premier retournement dès que le caillé est descendu du répartiteur dans les moules.
1 h 40 mn	Deuxième retournement.
1 h 50 mn	Troisième retournement suivi par le dépôt d'une plaque d'acier inoxydable de 380 g dans chaque moule.
17 h	Quatrième retournement avec élimination de la « rognure » au couteau et continuation du pressage.
22 h	Démoulage et salage en saumure.
22 h 50 mn	Sortie de saumure au bout de 35 mn, puis séchage à l'air.
24 h	Enrobage dans la cire ou mise en isolateur.

Pendant toute la fabrication la température de la pièce est maintenue à 30° C.

4) Caractéristiques du caillé modèle obtenu

En dépit des limitations imposées par le traitement thermique du lait et l'absence de levains lactiques il a été possible de produire de

façon reproductible un caillé de composition, de pH et de texture proches de certains fromages classiques en rappelant toutefois comme cela a été précisé dans l'introduction que le but était d'obtenir un caillé modèle et non de reproduire fidèlement tel ou tel fromage particulier.

De par le pH, l'extrait sec et la teneur en matière grasse (tab. 3) le caillé modèle s'apparente à un fromage à pâte pressée de type St-Paulin.

TABLEAU 3. — Caractéristiques du caillé modèle à 24 h

Extrait sec	(p. 100)	45,9*
Matière grasse	(p. 100)	20,5
Gras / sec	(p. 100)	44,6
pH		5,2

*Moyenne obtenue sur 13 échantillons de différentes fabrications.

Après 30 ou 60 j d'incubation à 12° C ces caractéristiques reproductibles d'un fromage à l'autre, et d'une fabrication à l'autre, restent très sensiblement les mêmes qu'au départ. La dégustation ne permet pas de détecter d'arômes ou de goût particuliers, ni de défauts que ce soit après 1 j ou 60 j d'incubation à 12° C. A 24 h le caillé modèle présente des caractéristiques gustatives très proches d'un fromage traditionnel à pâte pressée de même âge, avec peut-être moins d'arôme.

CONCLUSIONS

La méthode mise au point permet d'obtenir un caillé modèle répondant bien à l'objectif choisi.

Le caillé ne contient pas de micro-organismes, donc d'enzymes (à part la présure) capable d'interférer avec ceux que l'on désire introduire pour les étudier. En effet le caillé ne contient qu'un nombre très faible de bactéries, d'ailleurs sous forme de spores, qui ne peuvent se développer en raison de la présence des antibiotiques.

Les caractéristiques principales du caillé sont reproductibles et la souplesse de fabrication autorise de les modifier suivant le but recherché. En faisant varier la quantité de gluconolactone, le pH du

caillé peut être modifié entre des valeurs comprises entre 5,8 et 4,6, et dans ce dernier cas le caractère acide du caillé pourrait éventuellement être accentué en acidifiant légèrement le lait avant coagulation. Cependant du fait des difficultés rencontrées en raison de la fragilité du caillé acide lors des essais réalisés dans ce sens, cet aspect devrait être réétudié. De même la teneur en matière sèche du fromage peut être modifiée en jouant sur le temps de brassage du caillé entre les deux additions de gluconolactone ainsi qu'éventuellement sur la durée et la force du pressage. Des essais préliminaires effectués dans ce sens ont montré qu'on pourrait envisager de faire varier l'extrait sec du caillé entre 40 p. 100 et 55 p. 100.

Ce caillé peut servir à l'étude de l'influence de différents micro-organismes, en particulier celle de souches de bactéries lactiques seules ou combinées, ou même en association avec d'autres micro-organismes. Dans ce cas la fabrication est réalisée avec omission totale ou partielle de gluconolactone et bien entendu en absence d'antibiotiques. Des essais répétés avec une souche de *S. lactis* ont montré que les quelques *Bacillus* ayant résisté au chauffage ne se développent pas dans ce type de caillé. Pour des études portant sur des moisissures, *P. roqueforti* et *P. caseicolum*, on a observé que l'addition des antibiotiques utilisés évite le développement des bactéries sans pour autant nuire à la prolifération abondante des *Penicillium* en surface du caillé à condition bien entendu que les fromages soient placés en isolateurs aérés et pas enrobés dans la cire.

Le caillé modèle se prête bien à l'étude du rôle spécifique des enzymes dans la maturation et d'abord celui de la présure seule enzyme qui est toujours présente dans le caillé. L'addition de lipases, décarboxylases, désaminases et de certaines enzymes protéolytiques peut se faire dans le lait alors que celle d'autres enzymes protéolytiques plus actives susceptibles de modifier les propriétés du coagulum et d'entraver la fabrication, peut être effectuée à un stade plus avancé de la préparation du caillé.

D'autre part, un tel caillé modèle présente plusieurs avantages pour des recherches théoriques approfondies :

— celui de pouvoir étudier l'action d'enzymes (ou de micro-organismes) dans le « milieu fromage » c'est-à-dire autrement qu'en solution avec son substrat comme on le fait au laboratoire ;

— celui de permettre non seulement d'étudier l'aspect biochimique du rôle des enzymes, mais aussi d'envisager l'aspect rhéologique qui présente une grande importance dans le cas de l'action des enzymes protéolytiques dans la maturation.

Enfin, du fait que le caillé présente un goût neutre sans amertume ni autre défaut, il peut également servir de matériel pour des études portant sur les arômes caractéristiques des fromages formés

par telle ou telle enzyme ou micro-organisme ou provoqués par l'introduction de substances aromatiques seules ou en association.

Remerciements

Nous remercions MM. Hermier et Cerf pour les suggestions et critiques qu'ils ont faites à propos de ce travail.

Résumé

Le présent mémoire décrit la fabrication aseptique d'un caillé modèle destiné à servir de matériel pour des études générales portant sur la maturation des fromages et en particulier sur le rôle des micro-organismes et (ou) de leurs enzymes.

Ce caillé, dans lequel l'acidification est provoquée artificiellement par hydrolyse de la gluconolactone, est préparé à partir de lait ayant subi un traitement à 110° C dans un appareil U.H.T., et contient de plus des antibiotiques. L'influence néfaste du chauffage a été palliée par l'apport de chlorure de calcium, l'augmentation de la quantité de présure et de la température de coagulation. La technologie adoptée permet d'obtenir des variations contrôlées des valeurs de pH ou d'extrait sec à 24 h comprises respectivement entre 5,8 et 4,6 ou entre 40 p. 100 et 55 p. 100. Dans ces conditions aucun développement microbien n'est observé dans les fromages conservés à 30° C même après 75 j.

Summary

This paper reports the aseptic making of a model-curd, which will be used for general researches on cheese ripening, particularly in order to study the role of the microorganisms and/or their enzymes.

This model-curd was made with milk heated at 110° C in a pilot-plant U.H.T. sterilizer (of the milk-into-steam type). Nisin, penicillin and streptomycin were added, and acidification was obtained with sterile gluconic acid δ -lactone. The adverse effects of heating were solved by (i) adding calcium chloride, (ii) increasing the amount of rennet and (iii) increasing the coagulation temperature. This technology allow the choice in pH values between 5.8 and 4.6 and moisture contents from 40 to 55 p. 100. Under these proposed conditions there was no microbial growth in the model-curd after 75 days, when incubated at 30° C with aseptic precautions.

Reçu pour publication en avril 1975.

Références bibliographiques

- CERF (O.) et HERMIER (J.) (1972). — Diversité de la résistance des spores de *Bacillus* à l'eau oxygénée. *Le Lait*, 52, 1-20.
- CERF (O.) et HERMIER (J.) (1973). — Thermorésistance anormale de spores bactériennes chauffées par injection directe dans la vapeur. *Le Lait*, 53, 23-39.
- FOSTER (P. M. D.) and GREEN (M. L.) (1974). — A quantitative gel-filtration method for analysis of the proteinaceous fraction of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 41, 259-268.
- MABBITT (L. A.), CHAPMAN (H. R.) and BERRIDGE (N. J.) (1955). — Experiments in cheesemaking without strater. *J. Dairy Res.*, 22, 365-373.
- MELACHOURIS (N. P.) and TUCKEY (S. L.) (1966). — Changes of the proteins in Cheddar cheese made from milk heated at different temperatures. *J. Dairy Sci.*, 49, 800-805.
- OHMIYA (K.) and SATO (Y.) (1970 a). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part X. Autolysis of lactic acid bacterial cells in aseptic rennet curd. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 457-463.
- OHMIYA (K.) and SATO (Y.) (1970 b). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part XI. The ripening of aseptic rennet curd by *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus helveticus*. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1463-1469.
- PERRY (K. D.) and Mc GILLIVRAY (W. A.) (1964). — The manufacture of « normal » and « starter-free » Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions. *J. Dairy Res.*, 31, 155-165.
- PULAY (G.) and TOTH (S.) (1964). — The germicidal effect of hydrogen peroxide with special reference to the sterilization of cheese milk. *Tejipari Kut. Közl.*, 7, 3-16.
- REITER (B.), FRYER (T. F.), PICKERING (A.), CHAPMAN (H. R.), LAWRENCE (R. C.) and SHARPE (M. E.) (1967). — The effect of the microbial flora on the flavour and free fatty acid composition of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 34, 257-272.
- REITER (B.), SOROKIN (Y.), PICKERING (A.) and HALL (A. J.) (1969). — Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.*, 36, 65-76.
- WANG (D. I. C.), SCHARER (J.) and HUMPHREY (A. E.) (1964). — Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures. *Appl. Microbiol.*, 12, 451-454.
-