

## Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite

J.F. Chamba et F. Prost

*Institut Technique du Gruyère, Pré Germain, 74801 La Roche sur Foron Cedex, France*

(reçu le 16 janvier 1989, accepté le 26 avril 1989)

**Résumé** — La méthode retenue est basée sur la mesure de l'évolution du pH dans un lait écrémé reconstitué à 10% à partir d'une poudre spray low-heat ionisée à 20 kGy. Le lait est inoculé à 1% avec une suspension bactérienne dont la concentration est de 5 fois celle d'une suspension de D.O. = 1 à 650 nm. L'incubation a lieu dans un bain-marie dont la température est commandée par un programmeur qui reproduit l'évolution de la température du caillé pendant les 24 premières heures d'une fabrication standard de fromage à pâte cuite. En parallèle, nous suivons également l'évolution du pH du même lait ensemencé avec le même inoculum et incubé à 44 °C. L'écart type de répétabilité varie de 0,03 à 0,10 unité pH sur 22 souches et cultures utilisées lorsque les répétitions sont effectuées sur l'ensemble de la méthode (préparation des suspensions et acidification). Les mesures effectuées sur 52 cultures commerciales et 80 souches pures de bactéries lactiques thermophiles montrent qu'il existe une très grande diversité d'activité acidifiante, ainsi que de fortes différences de sensibilité au cycle thermique de la fabrication des fromages à pâte cuite. La méthode de mesure de l'activité acidifiante que nous avons mise au point peut être utilisée aussi bien pour sélectionner des souches que pour contrôler des cultures commerciales. La préparation d'un lait de référence à partir d'une poudre de lait écrémé low-heat irradiée à 20 kGy devrait permettre d'obtenir une bonne reproductibilité afin de comparer les résultats obtenus, soit au cours du temps, soit entre laboratoires.

**activité acidifiante — bactérie lactique thermophile — fromage à pâte cuite**

**Summary** — **Measure of acidifying activity of thermophilic lactic acid bacteria used in hard cheese manufacture.** The acidifying activity method proposed is based on the pH evolution measurement in a skim milk which is reconstituted (10% w/v) from a low-heat dried milk irradiated to 20 kGy. This milk is inoculated at 1% with a bacteria suspension, the concentration of which is five times D.O. 1 at 650 nm. Incubation is carried out in a water bath, the temperature of which is controlled by a programmed thermostat. This apparatus reproduces the temperature evolution of curd during the first 24 h in a hard cheese standard process. In parallel, we measure the pH evolution in the same inoculated milk incubated at 44 °C. The standard deviation of repeatability varies from 0.03 to 0.10 pH unit on 22 strains and cultures. This result is obtained when repetitions are realized on suspension preparation and acidification measurements. Measures carried out on 52 commercial cultures and 80 single strains reveal a large diversity of acidifying activities. Likewise, they show great differences of sensitivity under the thermal cycle of the hard cheese process. The acidifying activity method developed can be used to select strains or to control commercial cultures. The preparation of a standard milk with a low-heat skim milk which is irradiated to 20 kGy could give good reproductibility to compare results, either at different times or between laboratories.

**Acidifying activity — thermophilic lactic acid bacteria — hard cheese**

## INTRODUCTION

La fabrication des fromages à pâte cuite de type Emmental nécessite des levains de bactéries lactiques thermophiles composés principalement de *Streptococcus thermophilus*, de *Lactobacillus helveticus*, ou de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. En effet, ces espèces sont les mieux adaptées aux températures de la fabrication et de l'égouttage de ces fromages (Guittonneau, 1923). Un des rôles majeurs de cet ensemencement est d'assurer l'acidification du fromage sous presse. De la qualité de cette acidification dépendent l'égouttage du fromage, sa conservation — en particulier sa protection contre divers micro-organismes indésirables — l'orientation des phénomènes de l'affinage (fermentation propionique, protéolyse), la texture de la pâte et donc finalement la qualité du fromage affiné (Chamba et Chaillat, 1969; Accolas *et al.*, 1980). L'acidification du fromage sous presse est influencée par de nombreux facteurs comme la qualité du lait mis en œuvre, la température et la durée des phases de la fabrication et bien sûr l'activité acidifiante des levains utilisés. Cette activité des levains dépend à la fois de la préparation du levain (Champagne et Gagne, 1987) et des caractéristiques génétiques des souches composant le levain (Accolas et Auclair, 1970). En fait, mesurer l'activité acidifiante d'un ensemble de souches afin de les comparer pose de nombreuses questions sur les conditions de cette mesure : concentration cellulaire et état physiologique, dose de l'inoculum, température et durée de l'incubation, qualité du milieu de culture utilisé (lait en règle générale).

Pour s'affranchir de la forte influence de la concentration cellulaire de l'inoculum provenant de suspensions concentrées

congelées, Accolas et Auclair (1970) ont mis au point une méthode où ils comparent les dilutions bactériennes donnant la même acidification dans des conditions constantes de température et de durée d'incubation. Mais en règle générale, il est encore fréquemment utilisé un inoculum dont la concentration cellulaire n'est pas maîtrisée (F.I.L., 1980; Martley, 1983; Font de Valdez *et al.*, 1986). On peut se demander, cependant, quelle est la validité de comparaisons d'activités acidifiantes effectuées dans ces conditions. De plus, les volumes des inocula : 0,1% à 3% à partir des levains qui sont utilisés pour mesurer cette activité (F.I.L., 1980; Chazaud et Larpent, 1980) sont souvent plus massifs que les ensemencements utilisés dans la fabrication des fromages à pâte cuite qui sont généralement de 0,05% à 0,2% (Chamba et Cretin Maitenaz, 1985). Pour être comparative et proche de la pratique, une méthode de mesure de l'activité acidifiante doit utiliser un inoculum dont la concentration cellulaire est standardisée et qui produit une acidification voisine de celle observée avec les doses habituelles de levain. Pour cela, nous nous sommes inspirés de la méthode employée par Bouillanne et Desmazeaud (1980) où pour mesurer les activités enzymatiques, ils préparent une suspension de bactéries dont la concentration est standardisée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 650 nm.

Dans la majorité des cas, les activités acidifiantes sont obtenues par incubation à une température constante proche de la température optimale de l'espèce bactérienne testée. Ainsi, pour les bactéries lactiques thermophiles destinées à la fabrication des fromages à pâte cuite, les températures de 37 °C à 45 °C sont les plus fréquentes (Accolas et Auclair, 1970; Champagne et Gagne, 1987; Chazaud et Larpent, 1980; Desmazeaud et Hermier,

1972; Dutta *et al.*, 1972; Font de Valdez *et al.*, 1986; Tyler et Weiser, 1942).

Toutefois, Martley (1983) a montré que la température optimale et surtout la vitesse d'acidification à une même température (entre 20 °C et 60 °C) est différente d'une souche de *S. thermophilus* à l'autre. Or, le caillé des fromages à pâte cuite subit une évolution thermique importante lors de son acidification : l'emprésurage a lieu à 32-33 °C, après décaillage le mélange caillé-lactosérum est porté à 52-55 °C en 35 à 50 min et il est maintenu à cette température pendant environ 1 h.

Après moulage, le fromage se refroidit lentement sous presse pour atteindre 35 °C au centre de la meule 20 h après l'emprésurage, bien entendu, la partie périphérique se refroidissant plus rapidement (Accolas *et al.*, 1978). Ainsi, le choix d'une température constante n'apparaît pas comme représentatif des conditions réelles de l'acidification des fromages à pâte cuite. Aussi, pour mesurer l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles destinées à la fabrication des fromages à pâte cuite dans des conditions de température proches de celles de leur utilisation, il apparaît judicieux de les incuber dans un bain-marie programmé pour reproduire l'évolution thermique du fromage pendant l'acidification (24 h) comme cela est effectué en Suisse (F.I.L., 1980). En ce qui concerne l'influence de la qualité du lait et en particulier de son traitement thermique sur les bactéries lactiques thermophiles, elle a été bien établie il y a de nombreuses années (Tyler et Weiser, 1942; Auclair et Portmann, 1955). En règle générale, le chauffage du lait au-dessus de 60 °C pendant 20 min a un effet stimulant, mais il peut être inhibiteur lorsqu'il est particulièrement intense (stérilisation longue). Cependant, l'effet stimulant n'est pas identique

sur les différentes espèces de bactéries lactiques, voire sur deux souches différentes de la même espèce. Or, pour effectuer la mesure de l'activité acidifiante, il faut impérativement détruire la flore contaminante du lait car elle risque de modifier sensiblement les résultats obtenus. Il se pose, alors, le choix de la nature du traitement de destruction de cette flore. Dans le cas d'un traitement thermique, nous sommes face à deux exigences contradictoires. En effet, il doit être suffisamment sévère pour obtenir une destruction bactérienne efficace et être le plus modéré possible afin d'éviter que l'effet stimulant ne conduise à obtenir un résultat d'activité acidifiante trop éloigné du comportement des bactéries lactiques dans le lait utilisé pour la fabrication fromagère. Or, pour la fabrication des fromages à pâte cuite, on utilise soit du lait cru, soit du lait ayant subi un traitement thermique très modéré : 63-67 °C pendant 15 à 45 s (Chamba et Crestin Maitenaz, 1985).

Une solution peut consister à utiliser une poudre de lait écrémé spray "low-heat" à laquelle on ferait subir un traitement ionisant comme cela est déjà autorisé en France depuis 1975 pour les aliments d'animaux de laboratoire (Dillon *et al.*, 1986). La dose de réduction décimale (D.R.D. exprimée en kiloGray ou kGy) est de 0,1 à 8 kGy pour les bactéries Gram + et Gram-, sporulées ou non (Bolnot *et al.*, 1984). Un traitement ionisant conduisant à la stérilisation vraie d'un produit (radappertisation) demande 15 à 50 kGy et la mort des virus, donc des bactériophages, exige 20 kGy (Saint-Lebe et Raffi, 1986). Une irradiation à 20 kGy n'entraînerait pas de modifications physicochimiques supérieures à celles d'un traitement thermique modéré surtout avec un produit sec et sans lipide (Dillon *et al.*, 1986).

C'est en tenant compte de ce que nous venons de rappeler que nous avons mis au point une méthode de mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles qui devait répondre aux attentes suivantes :

- permettre la comparaison entre souches ou cultures;
- être la plus proche des conditions et du comportement observé au cours de la fabrication des fromages à pâte cuite;
- avoir une bonne répétabilité.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Levains utilisés

132 levains différents de bactéries lactiques thermophiles (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*) ont été utilisés pour cette étude (voir Tableau I). Les souches pures proviennent de plusieurs collections ou ont été isolées à partir de fromages, sérums de fromagerie et de laits crus. Les cultures commerciales ont été obtenues directement auprès des fournisseurs dans les conditionnements identiques à ceux proposés aux fromagers. La composition de ces cultures commerciales nous est généralement inconnue, elles peuvent contenir une ou plusieurs souches.

Tableau I. Répartition des levains étudiés.

Espèces	Souches pures	Cultures commerciales
<i>S. thermophilus</i>	38	35
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	20	0
<i>L. helveticus</i>	22	17
Total	80	52

### Milieux de culture

#### Les bouillons utilisés pour la préparation des suspensions cellulaires

La préparation préalable des suspensions bactériennes au test d'acidification se fait sur bouillon complexe. Les levains composés de streptocoques sont cultivés sur bouillon Elliker (Difco) (Elliker *et al.*, 1956) additionné de 35 g/l de lactose et de 5 g/l de glycérophosphate de sodium. Le pH du bouillon est ajusté à 6,8. Les levains composés de lactobacilles sont cultivés sur bouillon MRS (Difco) (Man *et al.*, 1960) additionné de 30 g/l de lactose. Le pH du bouillon est ajusté à 5,8. Les deux bouillons sont stérilisés à 120 °C pendant 15 min.

### Le lait

L'activité acidifiante des levains est évaluée sur lait. A partir d'une poudre de lait "low-heat" instantanée (INRA Poligny ou Prolait Niort), le lait est reconstitué à 10% (p/v) dans de l'eau distillée stérile.

### Contrôles bactériologiques

- Dénombrement de la flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR) sur Agar Plate Count (Merck) après 72 h d'incubation à 30 °C.
- Dénombrement des bactéries coliformes sur Agar lactosé au désoxycholate (Merck) en double couche, après 24 h d'incubation à 30 °C.

— Dénombrement des lactobacilles sur MRS (Difco) gélosé après 48 h d'incubation à 37 °C en anaérobiose.

— Dénombrement des streptocoques sur Elliker (Difco) gélosé après 48 h d'incubation à 37 °C.

— Dénombrement des spores de bactéries butyriques sur bouillon de Bryant et Burkey modifié Bergère (Biokar) après 7 jours d'incubation, selon la méthode décrite par le CNERNA (1986).

### **Chromatographie HPLC**

L'analyse est effectuée sur 100 µl d'une solution à 2% de la fraction azotée non protéique (NPN) obtenue après précipitation à l'acide trichloracétique (TCA) à 12%, ceci pour chaque échantillon de lait reconstitué à 10% (p/v). La chromatographie est réalisée sur un appareil Spectraphysics équipé d'une colonne Nucleosil C18 + précolonne SFCC.

Les échantillons sont élués par un gradient de solvants :

— Solvant A : acide trifluoroacétique (TFA) 0,125%,

— Solvant B : TFA 0,1% + acétonitrile 60%.

Le débit du solvant est de 1ml/min. La température de la colonne est de 37 °C.

La détection a lieu à 214 nm.

### **Préparation des suspensions cellulaires**

Préalablement à la mesure d'activité acidifiante, chaque levain doit être standardisé sur le plan physiologique et au niveau de sa concentration cellulaire. Ainsi, chaque levain est incubé sur bouillon complexe à 44 °C jusqu'à l'obtention d'une diminution de pH de 0,5 unité. Nous effectuons alors un transfert sur bouillon de même nature par ensemencement à 5%. Cette culture est incubée à 44 °C jusqu'à l'obtention d'un pH de  $4,8 \pm 0,1$ . A l'issue de l'incubation, les cellules sont recueillies par centrifugation à 4 000 g pendant 15 min. Le culot cellulaire est lavé deux

fois par dispersion dans une solution stérile contenant par litre 8,5 g de NaCl, 5 g de glycérophosphate de sodium, 1 g de Bactotryptone, 1 ml de Tween 80 et 0,5 g de chlorhydrate de cystéine.

La concentration cellulaire des suspensions est déterminée par turbidimétrie à 650 nm dans une cuve de 1 cm de chemin optique à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV 120-02).

Les suspensions standardisées ont une concentration 5 fois plus forte qu'une suspension cellulaire de D.O.1. Elles contiennent environ  $5 \cdot 10^8$  germes par ml.

### **Conditions expérimentales du suivi d'acidification**

200 ml de lait sont inoculés à 1% (v/v) à partir d'une suspension cellulaire standardisée. Deux types d'incubation sont utilisés :

— incubation à la température constante de  $44 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  : température proche de l'optimum de croissance des ferments lactiques thermophiles;

— incubation suivant un cycle thermique programmé reproduisant la succession des températures observées lors de la fabrication de l'Emmental.

Pour cela, un thermoplongeur (Haake D8) est asservi à un programmeur PT 01 (ITG - Annecy Electronique). Le cycle thermique utilisé est décrit dans la Fig. 1.

L'activité acidifiante de chaque suspension cellulaire est évaluée par mesure de pH, soit à partir de prélèvements aseptiques effectués sur la culture sur lait après 0, 2, 4, 6, 8 et 24 h d'incubation, soit par mesures directes dans la culture. Pour cela, une électrode à rodage (Schott), préalablement aseptisée (75 °C, 30 min) est placée dans la culture pendant la durée d'incubation. Les mesures sont effectuées toutes les deux heures pendant 24 h par un pH-mètre enregistreur (Hanna). En règle générale, nous effectuons au moins trois répétitions (préparation de la suspension standard et suivi d'acidification) pour caractériser l'activité acidifiante d'une souche ou d'une culture.

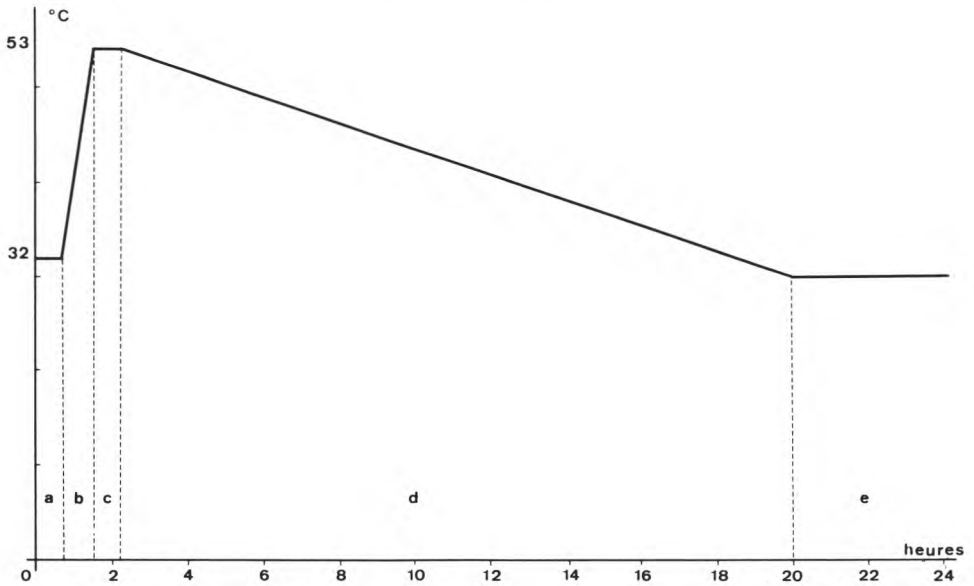


Fig. 1. Evolution de la température dans le bain-marie programmé. a. 32 °C – 40 min. b. 32 °C à 53 °C – 45 min. c. 53 °C – 40 min. d. 53 °C à 30 °C – 18 h. e. 30 °C – 4 h.

## RÉSULTATS

### *L'inoculum, choix de la dose*

Nous avons cherché à nous rapprocher le plus possible de l'ensemencement pratiqué en fromagerie et de l'acidification observée avec des levains industriels utilisés pour la fabrication des fromages à pâte cuite. Après divers essais préliminaires, un inoculum de 1% avec une suspension cellulaire concentrée 5 fois par rapport à une suspension de densité optique 1 à 650 nm a été retenu. Cette suspension contient, selon les souches et la préparation, entre 4,6 et 7,5  $10^8$  CFU/ml pour *S. thermophilus* et entre 3 et 5,4  $10^8$  CFU/ml pour *Lactobacillus*. A la dose de 1%, cela conduit à un ensemencement très proche de celui utilisé en cuve de fabrication.

Sur la Fig. 2, nous avons représenté les acidifications obtenues avec trois cultures différentes de *S. thermophilus* au

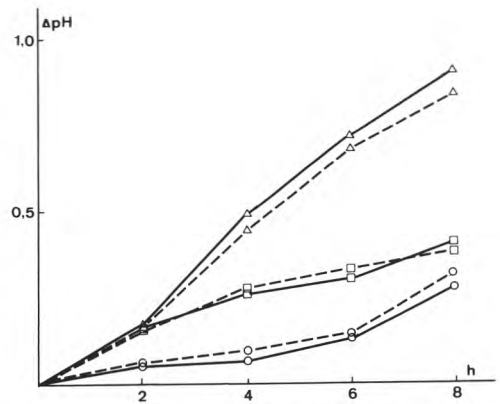


Fig. 2. Comparaison de l'acidification entre levains et suspensions standard de 3 cultures commerciales de *S. thermophilus* : culture A ( $\Delta$ ); culture B ( $\square$ ); culture C ( $\circ$ ); suspensions standard à 1% (v/v) (—); levains à 0,1% (v/v) (---).

**Tableau II.** Dénombrement de la flore contaminante sur la poudre de lait avant et après ionisation à 20 kGy.

	<i>Lait non traité</i>	<i>Lait ionisé</i>
Clostridia fermentant les lactates, spores (g)	13	- de 0,02
Flore mésophile aérobie revivifiable (CFU/g)	4 000	absence dans 5 g
Coliformes (CFU/g)	120	—
Lactobacilles (CFU/g)	1 530	—
Streptocoques (CFU/g)	2 100	—

cours des 8 premières heures d'incubation. Ces trois cultures ont été choisies à titre d'exemple car elles présentent une large gamme d'activités acidifiantes. Avec ces trois cultures, nous avons préparé d'une part des suspensions standard et d'autre part, des levains qui ont été utilisés pour la fabrication d'Emmental à la fromagerie expérimentale de l'ITG. La comparaison entre levain inoculé à 0,1% (v/v) et suspension standard à 1% (v/v) a été effectuée comme décrit la p. 421 et répété 3 fois. A l'examen de cette figure, nous constatons que les vitesses d'acidification obtenues avec les suspensions standard sont très voisines de celles observées avec les levains préparés avec ces cultures.

### **Effets de l'ionisation du lait**

Les résultats présentés dans le Tableau II correspondent à la flore revivifiable présente dans 1 g de poudre de lait. Des contrôles effectués sur 5 g de poudre de lait après ionisation ont montré l'absence de tout développement microbien. Par ailleurs, après reconstitution aseptique à 100 g/l dans de l'eau stérile, nous n'avons pas observé de coagulation du lait ionisé après une incubation de 5 jours à 30 °C alors qu'elle se produisait dès 24 h avec le

lait non traité. Le traitement ionisant utilisé à la dose de 20 kGy conduit bien à la destruction complète de tous les micro-organismes pouvant contaminer un lait en poudre.

La Fig. 3 (a-b) montre que l'ionisation ne conduit pas à une modification significative des peptides du lait. Le profil du lait ionisé n'est pas différent de celui du lait témoin non traité. En revanche, le traitement de stérilisation par chauffage (Fig. 3 a-c) modifie de façon importante la composition peptidique du lait analysé :

- apparition de plusieurs pics situés aux temps d'élution de 15 min — 28 min — 31 à 33 min;
- augmentation du pic situé à environ 36 min d'élution;
- disparition des produits sortant après 39 min d'élution.

Ainsi, il apparaît que l'ionisation à 20 kGy permet d'obtenir un lait stérile très proche du substrat non traité et beaucoup moins altéré sur le plan peptidique qu'un lait stérilisé par chauffage.

De plus, les ferments lactiques thermophiles testés montrent une croissance comparable sur lait ionisé et sur lait témoin non traité. En revanche, leur croissance est parfois inhibée, mais plus souvent stimulée sur lait stérilisé par chauffage. Ceci se traduit par une acidification accrue sur ce milieu par rapport au lait non traité. La Fig. 4 donne un exemple de la situation généralement rencontrée.

### Répétabilité

Elle a été évaluée selon deux procédures :

— 10 mesures en parallèle de l'acidification produite par une même suspension cellulaire standardisée. Pour cela, nous utilisons 10 électrodes reliées à 10 pH-mètre enregistreurs indépendants et mesurant l'évolution du pH dans 10 flacons

de laitensemencés et incubés dans le même bain-marie.

Le Tableau III présente les écarts types de répétabilité d'acidification après 4, 8 et 24 h d'incubation en cycle thermique obtenus avec cette procédure :

— 3 répétitions de la mesure de l'acidification produite par 22 cultures ou souches pures. Chaque essai est effectué à partir d'une suspension standard indépendante.

Le Tableau IV présente les différents écarts types obtenus après 4, 8 et 24 h d'incubation selon le type de ferment. La validité des résultats a été vérifiée par le test de « limite de contrôle de l'étendue » (AFNOR, 1974). Nous pouvons constater que les écarts types de répétabilité obtenus avec diverses souches et cultures sur l'ensemble de la méthode (préparation de la suspension standard + mesure de l'acidification) ne sont pas très différents de ceux obtenus lors de la mesure de l'acidification en parallèle sur 10 flaconsensemencés avec la même suspension standard.

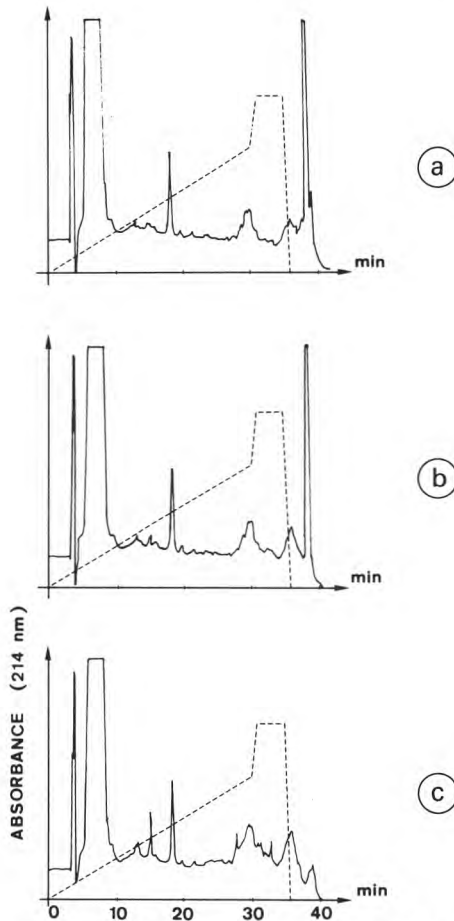


Fig. 3. Profils peptidiques obtenus par HPLC de trois échantillons du même lait. a. Lait non traité. b. Lait ionisé à 20 kGy. c. Lait autoclavé à 110 °C - 10 min.

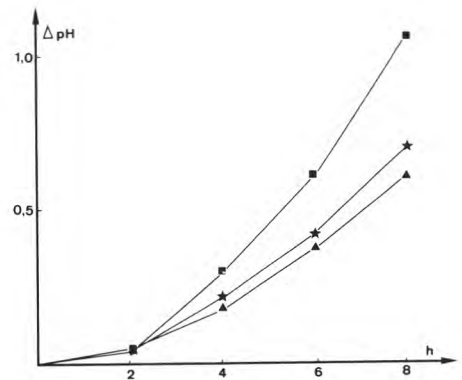


Fig. 4. Influence du traitement du lait sur l'activité acidifiante d'une souche de *L. helveticus* : lait non traité (▲); lait ionisé à 20 kGy (★); lait autoclavé à 110 °C en 10 min (■).

**Tableau III.** Répétabilité avec une souche pure de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (sur 10 observations simultanées).

Durée de l'incubation	4 h	8 h	24 h
$\Delta$ pH	0,68	1,62	2,74
Ecart type de répétabilité	0,03	0,07	0,07
Coefficient de variation (%)	4,4	4,3	2,6

**Tableau IV.** Ecart type de répétabilité de la mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles.

Durée d'incubation	<i>S. thermophilus</i>		<i>Lactobacillus</i> souches pures (N=10)	Ensemble (N=22)
	Souches pures (N=6)	Cultures commerc. (N=6)		
4 h	0,15	0,06	0,09	0,10
8 h	0,09	0,05	0,07	0,07
24 h	0,03	0,04	0,03	0,03

### Activité acidifiante de souches pures et de cultures commerciales de bactéries lactiques

La mesure de l'activité acidifiante en cycle thermique de 73 souches ou cultures commerciales de *S. thermophilus* et 59 souches ou cultures commerciales de lactobacilles (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*) donne des résultats très variés. En effet, nous avons obtenu des  $\Delta$ pH de 0,11 à 1,29 en 4 h avec *S. thermophilus* et de 0,11 à 2,43 en 8 h avec les *Lactobacillus*. Les histogrammes de la Fig. 5 montrent que la répartition des souches selon leur activité acidifiante est distribuée d'une façon quasi monotone. Toutefois, nous pouvons noter que l'activité acidifiante des

cultures commerciales de *S. thermophilus* se situe généralement entre 0,6 et 0,8 ( $\Delta$ pH en 4 h) et que celle des cultures commerciales de lactobacilles ne dépasse pas un  $\Delta$ pH de 1 en 8 h. De plus, près de la moitié (43%) des souches pures de lactobacilles testées ont une activité acidifiante supérieure à  $\Delta$ pH 1 en 8 h.

En règle générale, nous observons une plus grande vitesse d'acidification lors de l'incubation à la température constante de 44 °C qu'avec l'incubation en cycle thermique. Cette différence de vitesse d'acidification peut varier nettement d'une souche à l'autre comme le montre la Fig. 6 où est présenté un exemple caractéristique obtenu avec deux souches de *S. thermophilus*. Cette réduction plus ou moins forte de la

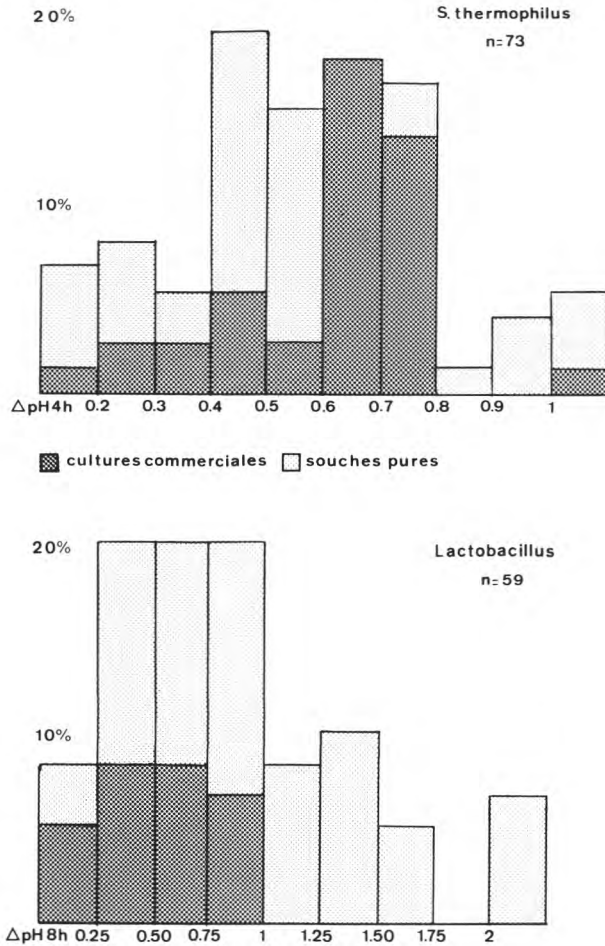


Fig. 5. Histogrammes de l'activité acidifiante de *S. thermophilus* et *Lactobacillus*.

vitesse d'acidification traduit la sensibilité des bactéries lactiques thermophiles au cycle thermique de la fabrication des fromages à pâte cuite. Pour exprimer cette sensibilité, nous avons calculé le rapport entre les acidifications (moyennes de trois répétitions) obtenues pour chacune des souches lors de l'incubation en cycle thermique ( $\Delta\text{pH}$  C.T.) et à température constante ( $\Delta\text{pH}$  44 °C). Ensuite, nous avons

classé les 80 souches pures et les 52 cultures commerciales testées selon ce rapport. Le résultat de ce classement figure dans le Tableau V où l'on peut constater que 42% des souches pures et 66% des cultures commerciales de *S. thermophilus* voient leur vitesse d'acidification réduite au moins de moitié; il en est de même pour 36% des souches pures et 82% des cultures commerciales de lactobacilles.

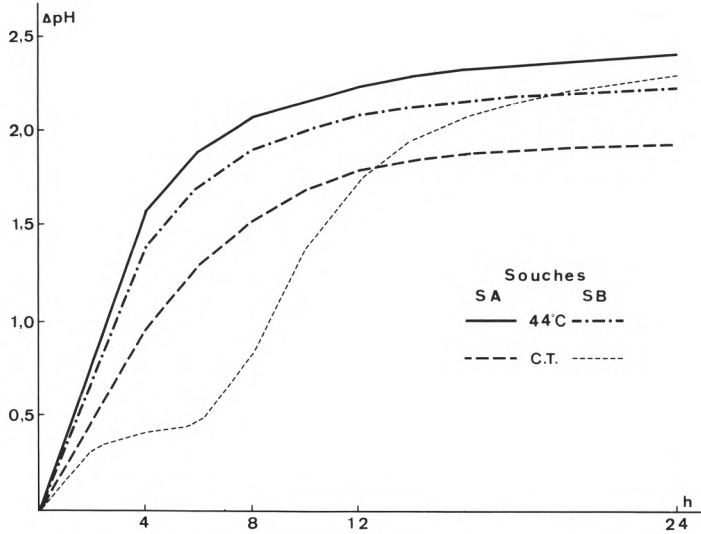


Fig. 6. Exemples d'acidification produite par deux souches de *S. thermophilus* incubées à température constante (44 °C) et selon le cycle thermique.

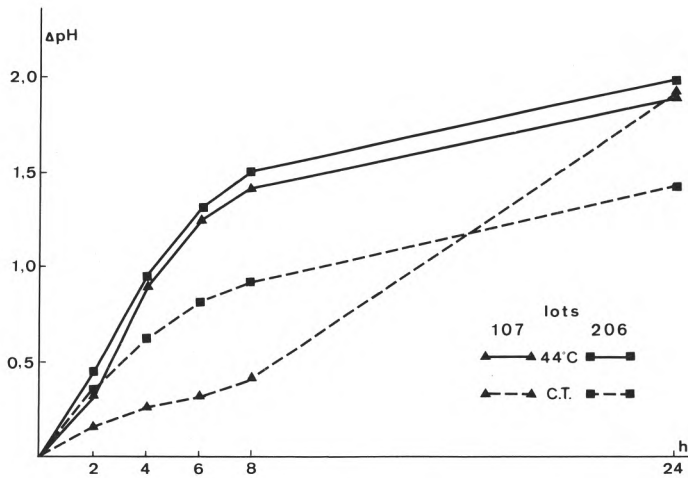


Fig. 7. Acidifications observées avec deux lots de la culture commerciale SC 2 (*S. thermophilus*).

**Tableau V.** Répartition des souches pures et des cultures commerciales selon leur sensibilité au cycle thermique (en %).

$\Delta pH_{CT}$	<i>S.thermophilus</i> (1)		<i>Lactobacillus</i> (2)	
	38 souches pures	35 cultures commerciales	42 souches pures	17 cultures commerciales
- de 0,2	—	—	7	12
0,2 à 0,3	10	3	9	23
0,3 à 0,4	21	20	10	41
0,4 à 0,5	11	43	10	6
0,5 à 0,6	21	17	19	6
0,6 à 0,7	16	14	5	6
0,7 à 0,8	16	—	9	—
0,8 à 0,9	5	—	12	—
0,9 et *	—	3	19	6

(1) : pH observés à 4 h et (2) : pH observés à 8 h

Enfin, la mesure de l'activité acidifiante en cycle thermique peut mettre en évidence une irrégularité dans l'activité de cultures commerciales que ne permet pas la mesure à température constante. Un exemple en est donné dans la Fig. 7. Il s'agit des résultats obtenus sur deux lots d'une culture de *S. thermophilus* commercialisés sous la même référence.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

En premier lieu, nos résultats montrent que l'irradiation à 20 kGy de la poudre de lait apparaît comme un bon moyen pour l'aseptiser afin de préparer un lait destiné à la mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques. En effet, ce traitement conduit à une stérilisation sans modification notable des composés peptidiques du

lait. Nous retrouvons bien ce qui était décrit par Bolnot *et al.* (1984) et Dillon *et al.* (1986). Cela explique que le comportement des bactéries lactiques thermophiles soit nettement moins modifié avec le lait ionisé que lorsque le lait est autoclavé.

La répétabilité que nous obtenons illustre l'intérêt de la standardisation des suspensions bactériennes utilisées pour la mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que la répétabilité que nous obtenons dépend en grande partie de la chaîne de mesure du pH. En effet, l'écart type de répétabilité obtenu lors de 10 mesures en parallèle de l'acidification produite par une même suspension standard n'est que légèrement inférieur à celui obtenu lors des répétitions avec différentes suspensions standard. L'écart type de répétabilité dépend donc essentiellement de la mesure du pH. Elle pourrait probablement être améliorée sur ce point. Ensuite,

cette répétabilité est au moins aussi bonne que celle obtenue par Accolas et Auclair (1970) et, comme eux, nous obtenons de meilleurs résultats avec les lactobacilles comparativement aux streptocoques thermophiles. Enfin, la bonne répétabilité observée avec les cultures commerciales montre que la méthode de culture et de préparation des suspensions standard est bien maîtrisable. Cette méthode permet de s'affranchir des différences de concentration des levains et donc d'effectuer des comparaisons d'activité. L'association d'un lait reconstitué n'exigeant pas une stérilisation par autoclavage la préparation d'une suspension standard apporte une amélioration par rapport aux méthodes précédemment proposées par la F.I.L. (1980). La suspension standard obtenue peut également être utilisée pour mesurer d'autres activités enzymatiques des bactéries lactiques.

Les mesures effectuées sur un grand nombre de cultures commerciales ( $N = 52$ ) et de souches pures ( $N = 80$ ) de bactéries lactiques thermophiles montrent qu'il existe une très grande diversité de l'activité acidifiante des bactéries lactiques. Cela avait déjà été observé par Bouillanne et Desmazaud (1980) sur 30 souches de *S. thermophilus* de la collection du CNRZ.

Toutefois, nous remarquons que l'activité des cultures commerciales est généralement moins dispersée. Ainsi, les 2/3 des cultures de *S. thermophilus* abaissent le pH de 0,6 à 0,8 unité en 4 h et la moitié des cultures de lactobacilles de 0,5 à 1 unité pH en 8 h. Cette diversité dans la vitesse d'acidification des souches et cultures de bactéries lactiques thermophiles offre donc un large choix pour satisfaire les différentes exigences technologiques comme le pense Martley (1983).

Cette diversité se retrouve également lorsque nous examinons la sensibilité thermique des streptocoques et des lactoba-

cilles thermophiles. Cela avait déjà été constaté avec une technique différente par Martley (1983). En effet, les vitesses d'acidification lors de l'incubation en cycle thermique varient de 10 à 100% de celles observées à la température constante de 44 °C. Là encore, nous retrouvons une plus faible dispersion des cultures commerciales qui, de plus, apparaissent plus sensibles que les souches pures. Ainsi, la quasi-totalité des cultures commerciales voit son activité acidifiante mesurée avec le cycle thermique réduite entre 30 et 80% de celle obtenue à 44 °C. Il est manifeste que cette adaptation des bactéries lactiques thermophiles au cycle thermique des fromages à pâte cuite n'a pas été prise en compte lors de la sélection des cultures commerciales.

En effet, nous avons trouvé des souches pures nettement moins sensibles au cycle thermique tout en ayant une activité acidifiante équivalente. Cela est particulièrement bien illustré dans l'exemple où nous avons observé une différence très nette d'activité acidifiante en cycle thermique entre deux lots d'une culture commercialisée sous la même référence. Cette culture de *S. thermophilus* est très probablement constituée, soit d'un mélange de souches, soit d'un mélange de variants de la même souche dont les proportions relatives étaient différentes entre les 2 lots, la souche ou le variant le plus thermosensible étant dominant dans le lot 107. Nous pouvons remarquer que cette sensibilité thermique constitue l'un des critères de l'aptitude des souches à la fabrication des fromages à pâte cuite (Martley, 1983). En effet, des souches peu sensibles à la température conduisent à une acidification plus régulière car moins influencée par l'évolution et les variations de la température du caillé en cuve et sous presse. De même, avec de telles souches, l'acidification sous presse sera plus homogène au

sein des fromages à pâte cuite où l'on sait qu'il existe un fort gradient de température (Accolas *et al.*, 1978).

Nous n'avons pas utilisé cette méthode pour mesurer l'activité de levains complexes contenant à la fois des streptocoques et des lactobacilles thermophiles. En effet, il ne semble pas possible de préparer une suspension standard contenant des proportions maîtrisées des deux genres bactériens. En revanche, nous avons étudié avec cette méthode le comportement d'association entre *S. thermophilus* et *Lactobacillus*. Pour cela, nous préparons séparément deux suspensions standard. La mesure de l'évolution du pH est effectuée dans des flacons ensemencés avec chacune des suspensions et avec l'association des deux.

La méthode de mesure que nous avons mise au point répond bien aux objectifs que nous nous étions fixés. Elle permet de caractériser l'activité acidifiante des bactéries lactiques dans des conditions proches de celles de la fabrication des fromages à pâte cuite. Elle peut être utilisée aussi bien pour sélectionner des souches que pour contrôler des cultures commerciales se présentant sous les formes les plus diverses, de la culture mère liquide jusqu'au levain lyophilisé pour l'ensemencement des cuves de fabrication. La préparation d'un lait de référence à partir d'une poudre aseptisée par irradiation à 20 kGy devrait permettre d'obtenir une bonne reproductibilité afin de comparer les résultats obtenus, soit au cours du temps, soit entre laboratoires.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient MM D. Le Bars et J.C. Gripon de la Station de Recherches Laitières,

INRA, Jouy-en-Josas, pour la réalisation des profils peptidiques des laits.

## RÉFÉRENCES

- Accolas J.P. & Auclair J. (1970) Détermination de l'activité acidifiante des suspensions concentrées congelées de bactéries lactiques. *Lait* 50, 609-626
- Accolas J.P., Hemme D., Desmazeaud M.J., Vassal L. & Bouillanne C. (1980) Les levains lactiques thermophiles : propriétés et comportement en technologie laitière — une revue. *Lait* 60, 487-524
- Accolas J.P., Veaux M., Vassal L. & Mocquot G. (1978) Evolution de la flore lactique thermophile au cours du pressage des fromages à pâte cuite. *Lait* 58, 118-132
- AFNOR (1974) *Recueil des normes statistiques*. Tome 1, 1<sup>o</sup> Edition, Edition AFNOR, Paris
- Auclair J. & Portmann A. (1955) Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. I. Croissance des bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables. *Ann. Technol. Agric.* 2, 121-131
- Bolnot F., Carlier V. & Rozier J. (1984) Les radiations ionisantes; leurs effets sur les causes d'altération des aliments. *Rev. Tech. Vét. Alim.* (3) 23-35
- Bouillanne C. & Desmazeaud M.J. (1980) Etude de quelques caractères de souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées en fabrication de yoghourt et proposition d'une méthode de classement. *Lait* 60, 458-473
- Chamba J.F. & Chaillet B. (1969) L'acidification sous presse. *Tech. Lait.* (647), 14-15
- Chamba J.F. & Cretin Maitenaz P. (1985) Les fromages à pâte cuite. In : *Laits et Produits Laitiers*. Tome 2. (Luquet F.M. ed.) Technique et Documentation Lavoisier-Apiaria, Paris 232-253
- Champagne C. & Gagne D. (1987) Activité acidifiante de trois souches de *Streptococcus thermophilus* cultivées sur milieux tamponnés commerciaux. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 20, 34-37
- Chazaud M.T. & Larpent J.P. (1980) Stimulation de l'activité des ferments lactiques par l'extrait de levure. *Rev. Lait. Fr.* (383), 19-24

- CNERNA (1986) Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de Clostridia par la méthode de culture en milieu liquide. *Rev. Lait. Fr.* (451), 39-45
- Desmazeaud M.J. & Hermier J.H. (1972) Isolement et détermination de la composition qualitative de peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 28, 190-198
- Dillon J.C., Joyeux J., Levillain M. & Brechet V. (1986) Les traitements ionisants des produits alimentaires : effets sur la valeur nutritionnelle. *Cah. Nutr. Diét.* 21, 461-470
- Dutta S.M., Kuila R.K., Arora B.C. & Ranganathan B. (1972) Effect of incubation temperature on acid and flavor production in milk by lactic acid bacteria. *J. Milk Food Technol.* 35, 242-244
- Elliker P.R., Anderson A.W. & Hanneson G. (1956) An agar medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 39, 1611-1612
- F.I.L. (1980) Starters in the manufacture of cheese. Evaluation of the acidifying activity of thermophilic starters. *Doc.* 129, 13-14
- Font de Valdez G., Savoy de Giori G., Pesce de Ruiz Holgado A. & Oliver G. (1986) Stability of freeze-dried lactic acid bacteria during storage. *Microbiol. Alim. Nutr.* 4, 237-240
- Guittonneau G. (1923) Les Principes d'une Technique Rationnelle en Industrie Laitière. Le Rôle des Micro-organismes en Laiterie. Ed. *Le Lait*, Lyon
- Man de J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-138
- Martley F.G. (1983) Temperature sensitivities of thermophilic starter strains. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 18, 191-196
- Saint-Lebe L. & Raffi J. (1986) Le traitement ionisant des produits alimentaires *C.R. Acad. Agric. Fr.* 72, 681-689
- Tyler M.E. & Weiser H.H. (1942) Factors affecting swiss cheese activity. Effect of heat-treatment and source of milk. *J. Dairy Sci.* 25, 939-948