

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التّعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قلّمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vu de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Alimentaire
Spécialité/Option : Production et Transformation Laitières
Département : Ecologie et Génie de l'Environnement

Thème

**Essais de fabrication de ferment lactique à partir de laits
produits en zones de montagne**

Présenté par : **CHERIET Fares Islam**
MEHARZI Zakaria
MOSBAH Hamza

Devant le jury

Encadreur

Mr. CHEMMAM M. Pr **Université 8 mai 1945 Guelma**

Présidente

Mme. SOUIKI-SOUMATI L. Pr **Université de Guelma**

Examineur

Mr. BOUSBIA A. MCA **Université de Guelma**

Juin 2022



Remerciements

*Au terme de ce travail, nos remerciements aillent d'abord à **Allah** de nous avoir donné la santé, le courage et de la patience pour être ce que nous sommes aujourd'hui et pour mener à terme ce modeste travail.*

Nous remercions aussi très sincèrement les membres du jury

*La présidente **Mme Souiki-Soumati Lynda (Professeur)**, ainsi que l'examineur **Mr Bousbia Aissam (MCA)** d'avoir accepté avec grande sympathie d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements, notre gratitude à notre encadreur, **Pr Chemmam Mabrouk** d'avoir encadré ce travail avec beaucoup de compétences, pour son aide, ses précieuses orientations, ses conseils et sa disponibilité. Nous vous remercions pour vos qualités scientifiques et humaines. Nous vous remercions pour la confiance que vous avez placée en nous laissant une impressionnante liberté de travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect les plus distingués.*

*Nos sincères remerciements et notre profonde gratitude vont à tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie de **l'Université 8 mai 1945 Guelma** et particulièrement ceux qui nous ont formés pendant notre cursus, pour leur qualité d'enseignement qui nous a aidé à réaliser ce travail.*



Cheriet Fares Islam, Meharzi Zakaria, Mosbah Hamza

SOMMAIRE

Résumé Français	I
Résumé Anglais	II
Résumé Arabe	III
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	V
Liste des photos	VI

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction	1
CHAPITRE I Caractéristiques du lait cru	2
1.1. Caractéristiques nutritionnelles	2
1.1.1. L'eau	2
1.1.2. Matière grasse	2
1.1.3. Les protéines	3
1.1.4. Les glucides	4
1.1.5. Matières minérales	4
1.2. Caractéristiques physicochimiques	5
1.2.1. La densité	5
1.2.2. L'acidité titrable ou l'acidité Dornic	5
1.2.3. Point de congélation	5
1.2.4. Le pH	5
1.2.5. Acidification et acidité du lait	6
1.2.6. Les cinétiques d'acidification	6
CHAPITRE II Variations des caractéristiques du lait cru	7
2.1. Les principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait	7
2.1.1. Le pH	7
2.1.2. L'activité de l'eau (A_w)	7
2.2. La diversité des microorganismes associés aux laits	8
2.2.1. En termes de genres	8
2.2.2. Espèces et de souches	8
2.3. Rôle de la microflore de lait	9
2.3.1. Préservation de la diversité microbienne	9
2.4. Evolution de la microflore du lait dans la pâte du fromage au cours de l'affinage	10

2.4.1. Prédominance de la microflore du lait dans la pâte du fromage au cours de l'affinage	10
2.5. Microflore du lait et bénéfices potentiels pour la santé	12
2.5.1. Lait/microflore du lait et allergies	12
2.6. Les flux microbiens à la ferme	13
2.6.1. Le réservoir trayon : sa composition et les pratiques influents	15
2.6.1.1. La variabilité des flores microbiens en surface des trayons	15
2.7. Les facteurs liés à l'environnement des animaux	15
2.8. Le réservoir machine à traire : sa composition et les pratiques influents	16
2.8.1. Des biofilms présents à la surface de la machine	16
2.9. Dans les exploitations bovines	17
2.10. Microorganismes utilisés dans l'industrie laitière	17
2.10.1. Bactéries lactiques de lait	17
2.10.1.1. Types de bactéries lactiques	17
2.10.2. Levures	19
2.10.3. Moisissures	19
2.10.4. La fermentation et l'aptitude fermentaire du lait	20
2.10.4.1. Les ferments lactiques	20
2.10.4.2. Les ferments du commerce	21
2.10.4.3. Les ferments naturels (Flore indigène)	22
2.11. Caractérisation du caillage en fromagerie	23

CHAPITRE III Aptitude fermentaire 25

3.1. Les bactéries lactiques	25
3.1.1. Facteurs microbiologiques influençant le métabolisme des bactéries lactiques	26
3.1.1.1. Le pH	27
3.1.1.2. La température	30
3.1.1.3. L'acidité Dornic	30

ETUDES EXPERIMENTALE

Introduction	31
I. Matériels et méthodes	31
1.1. Choix de région d'étude	32
1.2. Prélèvements	32
1.3. Analyses et mesures	33

1.3.1. Analyses physicochimiques	33
1.4. Aptitude fromagère du lait cru	33
1.4.1. Aptitude fermentaire naturelle du lait cru	34
1.4.2. Pouvoir acidifiant du lactosérum	34
1.5. Sélection et testage du ferment	35
1.5.1. Thermisation du lait	35
1.5.2. Test de floculation	35
1.6. Essais de fabrication	36
1.7. Estimation de fabrication	36
II. Résultats	37
2.1. Paramètres physicochimiques	37
2.1.1. Calcul du rendement fromager	38
2.2. Aptitude fermentaire du lait cru	38
2.3. Pouvoir acidifiant du lactosérum	39
2.4. Thermisation et incubation	40
2.4.1. Traitement du levain	40
2.5. Essais de fabrication, floculation, coagulation	42
2.5.1. Doses et ferments testées pour la floculation	42
2.5.2. Fabrication	44
2.5.3. Observations du caillé	46
III. Synthèse	49
Conclusion et perspectives	50
Références	

Résumé

Du lait cru de mélange a été prélevé au niveau de 3 zones en régions de montagne sur les wilayates de Guelma et Souk-Ahras en vue de l'étude de leurs aptitudes fromagères. Les résultats ont révélé que le lait cru de ces zones, à une bonne aptitude fermentaire $> 45^{\circ}\text{D}$ et un bon pouvoir acidifiant $>25^{\circ}\text{D}$. La sélection de levains naturels (LM : Levain mère et LFT : Levain Fille Thermisé), à donner des cinétiques d'acidification (pH et $^{\circ}\text{D}$) lentes et rapides en fonction des températures de thermisation et incubation.

Les essais de floculation, coagulation ont varié en fonction des doses de repiquage du ferment du commerce et des ferments lactiques sélectionnés (LM et LFT).

On peut dire que fabriquer soi-même un ferment avec les microflore spécifiques de la ferme est utile pour éviter d'utiliser les microflore « standardisées » des ferments du commerce.

Mots clés: lait cru, presure, ferment commerce, ferment naturel, fromage

Summary

Raw blended milk was taken from 3 mountain areas on the wilayates of Guelma and Souk-Ahras to study their cheese skills. The results showed that the raw milk from these zones, have a good fermentability $> 45^{\circ}$ D and a good acidifying power 25° D. The selection of natural leavens (LM: Mother leaven and LFT: Leaven (Thermised Daughter), to give slow and rapid acidification kinetics (pH and $^{\circ}$ D) as a function of the thermising and incubation temperatures.

The flocculation and coagulation tests varied according to the transplant doses of the commercial ferment and the selected lactic ferments (LM and LFT).

It can be said that making a ferment yourself with the specific microflares of the farm is useful to avoid using the "standardized" microflores of commercial ferments.

Keywords: Keywords: raw milk, presure, commercial ferment, natural ferment, cheese

ملخص

تم جمع عينات من الحليب الطازج على مستوى ثلاث مناطق جبلية من ولايتي قالمة وسوق اهراس، حتى تتم عليه دراسة قدرات تحويله الى اجبان.

أعطت نتائج هذا الحليب على قدرات جيدة للتخمير أكبر من $D^{\circ}45$ ، وتحمض وعند إضافة مصله نجد قدرة التخمر أكبر من $D^{\circ}25$. كما تم انتخاب خمائر طبيعية مستخلصة منه ام وبنيت أعطت نتائج تجربة استعمالهما منحنيات تحميض سريعة وبطيئة وكان هذا حسب درجة التسخين والحضن. أعطت تجارب التكتل والترويب نتائج مختلفة حسب التركيز والمخمرات المستعملة: الصناعية منها والطبيعية.

نستخلص ان انتخاب المخمر الطبيعي الخاص بظروف مكان ونتاج الحليب الطازج مهم حيث نجتنب استعمال المخمرات الصناعية.

الكلمات المفتاحية: حليب طازج، مخمر طبيعي، مخمر صناعي، جبن.

Liste des abréviations

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée, France.

ATP : Adénosine-Triphosphate.

A_w : l'Activité de l'eau.

BCP : Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.

°C : Degré Celsius.

Caséines κ : Kappa caséines.

CRB : Les centres de ressources biologiques.

D° : Degré Dornic.

EPS : Exopolysaccharides.

ESD : Extrait sec dégraissé.

FF : Fromage Frais.

FM : Fromage mollé.

FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable.

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale.

FP : Fromage Pressé.

Gram⁻ : Gram négative.

Gram⁺ : Gram positive.

H₃O⁺ : Ions hydronium.

IMCU : la Force Coagulante.

LC : Levain de Commerce.

LFT : Levain Fille Thermisé.

LM : Levain Mère.

LPS : Lipopolysaccharides.

MCLARCH : Un mélange de souches d'origine naturelle, (*Lactococcus lactis subsp. lactis* et *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*).

MG : Matière grasse.

NSB : Ferment lactique pour ensemencement direct, thermophile.

NSLAB : Non Starter Lactic Acid Bacteria.

NT : Ferment Lactique acidifiant Mésophiles.

NZE : Ferment lactique ensemencement direct. Mélange thermophiles + Mésophiles. Pour pâtes pressées, pâtes molles.

Omega-3 : Acides gras polyinsaturés.

P : Présure.

pH : Potentiel hydrogène.

pKa : Constante d'équilibre.

TB : Taux butyreux.

TP : Taux protéique.

UFC : Unité Formant Colonie.

YOYO : Mélange des souches d'origine naturelle : *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Liste des tableaux

Titre	Page
1. Composition générale du lait de vache (Vignola, 2002)	2
2. Répartition des éléments ioniques du lait (en mg/L⁻¹) (Gaucheron, 2004)	4
3. Inventaire de la diversité des bactéries et levures dans du lait cru de vache (Mallet et al, 2010 ; Saubusse et al, 2007)	8
4. Exemple d'utilisations des principales moisissures retrouvées en alimentaire (adapté de Lucile et al, 2016)	21
5. Comparaison entre les deux modes de coagulation	23
6. Caractéristiques des espèces bactérien dans l'industrie laitière (Sylvie et al, 2004)	25
7. Coordonnées GPS des zones d'élevage	32
8. Précision des paramètres mesurées avec (Lactoscan SP)	33
9. Résultats des paramètres physicochimiques	37
10. Résultats du pouvoir acidifiant global (PAG)	39
11. Dosage des ferments résultats des tests de la vitesse de floculation, coagulation	43
12. Dosage des ferments retenus en fabrication	45
13. Observations des caillé après de coagulation	47

Liste des figures

Titre	Page
1. Evolution de l'acidité Dornic et du pH au cours de la fabrication (Sylvie et al, 2004)	6
2. Flux microbiens dans les étables de production laitière	14
3. Répartition géographiques des zones d'élevage retenues	32
4. Taux des matières utiles	37
5. Aptitude fermentaire du lait cru à 24h	39
6. Pouvoir acidifiant du lactosérum (°D et pH)	40
7. Pouvoir acidifiant du lait thermisé, levain mère (LM) et levain fille thermisé (LFT) en fonction de la température de traitement (T55 - T65) et d'incubation (I37 et I44)	41

Liste des photos

Titre	Page
1. Ferments testés	42
2. Test de floculation	43
3. Fromage frais (PFC)	44
4. Fromage frais (FC)	44
5. Fromage pressée (LM, LFT, FC, P, PFC)	45
6. Fromage à pâte molle (LM, LFT, FC, P, PFC)	45
7. Fromage à pâte fraîche (FF)	46
8. Fromage à pâte molle (FM)	46
9. Fromage à pâte pressée (FP)	47

Etude

Bibliographique

Introduction

En Algérie la technologie fromagère de type lactique n'est pas bien connue et en premier lieu dans les milieux ruraux, ou la transformation de l'excédent de lait demeure basée sur la transmission d'un savoir-faire ancestral. Pour ces éleveurs, la quasi-totalité du revenu est constituée de la vente de lait cru, lait fermenté et rarement du fromage. Cette fabrication réalisée de manière traditionnelle à partir de lait cru, se différencie en bien des points de la transformation industrielle. Parmi ses spécificités, une des pratiques discriminantes est l'utilisation de ferments fermiers (constitués de flores indigènes de l'exploitation). Le ferment fermier le plus couramment utilisé est le lactosérum, petit lait prélevé sur la transformation de la veille, pour ensemercer le lait du jour. Cette technique appelée repiquage est garante de la spécificité des produits de la ferme et donc considérée par les éleveurs transformateurs, comme essentielle à maintenir.

Ce travail a pour objectif de développer une méthode de culture de ferments indigènes utilisables en technologie lactique qui, sous certaines conditions, pourrait se substituer au lactosérum en cas de défaillance de ce dernier ou pour permettre de reprendre la production avec des microflore indigènes après un accident ou une période d'arrêt d'activité.

L'idée est de fabriquer soi-même un ferment avec les microflore spécifiques de la ferme, pour éviter d'utiliser les microflore «standardisées» des ferments commerciaux. Les ferments fermiers étudiés étaient basés sur la mise en fermentation à température contrôlée de lait soit issu de la traite manuelle de plusieurs de vaches (présümées saines). Après fermentation, l'objectif est que ces ferments aient atteint une acidité de 75°Dornic, qu'ils se présentent sous forme d'un gel d'aspect et d'odeur comparable à un bon caillé de fabrication.

Chapitre I

CHAPITRE I. Caractéristiques du lait cru

1.1. Caractéristiques nutritionnelles

Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une solution colloïdale, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion (Vuilleumard, 2018). Chacun des constituants du lait possède une structure et des propriétés physicochimiques spécifiques. Sa composition varie selon différents facteurs liés aux animaux, les principaux étant l'individu, la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge. Pour connaître la composition exacte d'un échantillon de lait, il est indispensable de faire une analyse quantitative de chacun des constituants majeurs **Tableau 1 (Vignola, 2002)**.

Tableau 1. Composition générale du lait de vache (Vignola, 2002).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 – 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Glucides	3,6 – 5,5	4,6
Minéraux	0,7 – 0,9	0,8
Constituants mineurs : enzymes, vitamines, pigments, cellules diverses, gaz.		

1.1.1. L'eau

L'eau est quantitativement l'élément le plus important : 900 à 910 g par litre. En elle, sont dispersés tous les autres constituants du lait et de la matière sèche (Mathieu, 1998).

1.1.2. La matière grasse

La matière grasse (MG) est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0.1 à 10.10⁻⁶ m et est essentiellement constituée de triglycérides (98%), de phospholipides (1%) et d'une fraction insaponifiable (1%) [Cholestérol et de β carotène] (Kuzdzal, 1987). La matière grasse représente à elle seule, la moitié de l'apport énergétique du lait. Elle est constituée de 65% d'acide gras saturé et de 35% d'acide gras insaturé, parmi ceci l'acide gras polyinsaturé (Vignola, 2002) :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

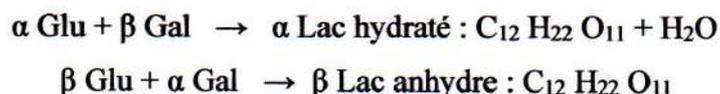
- ❖ **Les Phospholipides** du lait sont classés comme lipides complexes. Dans le lait, on distingue trois types de phospholipides : les lécithines, les céphalines et les sphingomyélines (**Cayot et Lorient, 1998**). Cette dernière est dû à leur capacité amphipolaire caractérisée par une présence d'une partie hydrophile, qui s'associe à l'eau, et d'une partie lipophile qui s'associe aux constituants du globule de matière grasse (**Ratray et al, 1997**).
- ❖ **Les Triglycérides** sont des esters du glycérol, c'est-à-dire qu'ils sont formés par condensation de trois molécules d'acides gras sur une molécule de glycérol (**Walstra, 1999**).
- ❖ **Les fractions insaponifiables** regroupent l'ensemble des constituants de la matière grasse qui ne réagissent pas avec la soude ou la potasse pour donner des savons, et qui après saponification, sont insolubles dans l'eau en milieu alcalin mais reste solubles dans des solvants organiques non miscibles à l'eau. On retrouve principalement dans les fractions insaponifiables des stérols, les caroténoïdes, les xanthophylles et les vitamines A, D, E et K. Le plus important des stérols est le cholestérol (**Peereboom, 1969**). La consommation de la matière grasse laitière est indispensable dans l'alimentation et elle est source des vitamines A, D et E (**Champagne et al, 1984**).

1.1.3. Les protéines

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers. L'analyse du lait par la méthode Kjeldahl, avec une double minéralisation, à chaud puis froid. Les composés azotés non protéiques sont principalement des protéases, des peptones et de l'urée. Différentes structures et propriétés physicochimiques distinguent les protéines du lait (**Vignola, 2002**). On les classe en deux catégories d'après leur solubilité dans l'eau et leur stabilité : d'une part, les différentes caséines qui sont en suspension colloïdale, qui se regroupent sous forme de micelles et qui précipitent sous l'action de la présure ou lors de l'acidification à un pH d'environ 4,6, d'autre part, les protéines du sérum qui sont en solution colloïdale et qui précipitent sous l'action de la chaleur (**Vignola, 2002**).

1.1.4. Les glucides

Le lait contient des glucides essentiellement représentés par le lactose, qui est son constituant le plus abondant après l'eau (Mathieu, 1998). Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50 g par litre. C'est un disaccharide constitué par de l' α ou β glucose uni à du β galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses (Luquet, 1985) :



Le lactose est fermentescible par de nombreux micro-organismes et il est à l'origine de plusieurs types de fermentations pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers (Morrissey, 1995).

1.1.5. Matières minérales

Selon Gaucheron, (2004), le lait contient des quantités importantes de différents minéraux (Tableau 2). Les principaux minéraux sont le calcium, le magnésium, le sodium et le potassium pour les cations et le phosphate, le chlorure et le citrate pour les anions.

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les ions calcium, phosphore, magnésium et soufre existent dans les deux fractions (Mathieu, 1998).

Tableau 2. Répartition des éléments ioniques du lait (en mg/L⁻¹) (Gaucheron, 2004).

	Total	Soluble	% colloïdal
Potassium	1,600	1,500	6
Sodium	0,425	0,400	6
Chlore	1,100	1,100	0
Calcium	1,200	0,350	70
Magnésium	0,115	0,070	40
Phosphore	0,950	0,420	55
Citrate	1,650	1,500	11

1.2. Caractéristiques physicochimiques

Les principales propriétés physicochimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la densité, le point de congélation et l'acidité (Vignola, 2002).

1.2.1. La densité

La masse volumique du lait à 20°C est d'environ 1,030 g/ml. Elle varie en fonction de la composition du lait, notamment de sa teneur en matière grasse qui a un effet prépondérant en raison de sa variabilité suivant la race et l'alimentation. Connaissant les concentrations (en g.L⁻¹) en extrait sec dégraissé (ESD) et en matière grasse (MG) d'un lait ou d'un de ses dérivés (Croguennec et al, 2008). Par conséquent, plus la teneur en solides non gras est élevée, plus la densité du produit laitier sera élevée. On peut donc affirmer qu'un écrémage du lait augmentera sa densité et qu'un mouillage ou une addition d'eau la diminuera (Vignola, 2002). Selon le même auteur la densité du lait à 15°C varie de 1,028 à 1,035g/ml pour une moyenne de 1,032g/ml.

1.2.2. L'acidité titrable ou l'acidité Dornic

Selon Veisseyre (1975) un lait frais normal à une acidité titrable de 16° à 18° degré Dornic c'est à dire 16 à 18 en décigrammes d'acide lactique par litre.

1.2.3. Point de congélation

Pour le lait de vache, le point de congélation est égal à environ -0,53°C. Il résulte principalement de l'effet dépresseur du lactose et des ions monovalents (Cl⁻, Na⁺, K⁺), qui contribuent pour environ 75 à 80% à l'abaissement cryoscopique total. Il est utilisé pour déterminer une modification du lait (mouillage, hydrolyse du lactose, etc.) (Croguennec et al, 2008).

1.2.4. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H₃O⁺) et donc une diminution du pH, car : $\text{pH} = \log 1/ [\text{H}_3\text{O}^+]$.

A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait (CIPC, 2011).

1.2.5. Acidification et acidité du lait

L'acidification est définie comme le résultat de la fermentation du lait par des bactéries lactiques avec une dégradation du lactose entraînant une production d'acide lactique et donc une baisse notable du pH (Sylvie et al, 2004).

1.2.6. Les cinétiques d'acidification

Cela induit une modification du pH et une cinétique d'acidification qu'il est possible de représenter par une courbe. On distingue deux types de profil d'acidification : un profil lent et un profil rapide **Figure 1** (Sylvie et al, 2004).

Suivant le contexte du producteur, on recherchera plutôt un profil lent ou rapide. Le profil lent donne en général des pâtes fromagères plus fines, alors que le profil rapide permet une meilleure protection par rapport aux pathogènes. Il est souhaitable de se situer entre ces deux types de profil mais pas au-delà de ces bornes (Sylvie et al, 2004).

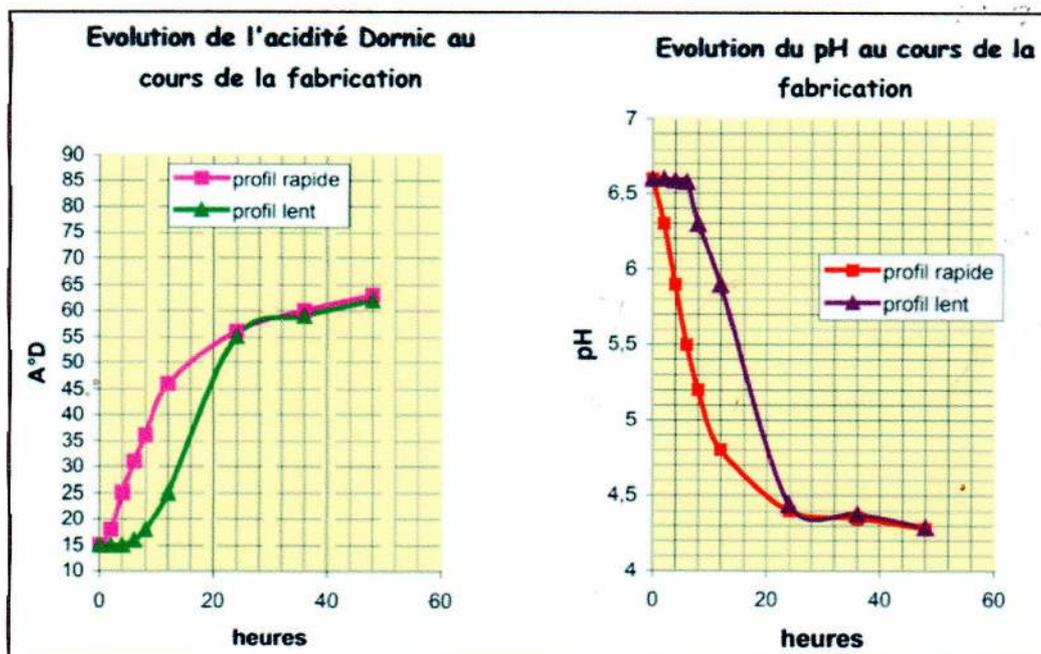


Figure 1. Evolution de l'acidité Dornic et du pH au cours de la fabrication Sylvie et al, 2004

Chapitre II

CHAPITRE II : Variations des caractéristiques du lait cru

Les micro-organismes présents dans le lait ont été historiquement utilisés pour la transformation et la conservation du lait. Les laits fermentés sont consommés depuis la plus haute antiquité. Associée à l'action de la présure, la flore microbienne des laits permettra la production d'une gamme très diversifiée de fromages. Ainsi, la flore naturelle du lait, au départ principal facteur de sa dégradation, a été sollicitée pour ses propriétés acidifiante, protéolytique, lipolytique et aromatique par des savoir-faire localisés et transmis de génération en génération.

2.1. Les principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait

2.1.1. Le pH

La grande majorité des bactéries et champignons ont la capacité de se développer à un pH proche de la neutralité, correspondant à celui du lait ou à celui trouvé à la surface de fromages à croûte lavée par exemple (pH 6,5 à 7). Cependant, les champignons et diverses bactéries lactiques se développent mieux à pH plus bas, ce qui leur confère un avantage au cours des premières étapes de la transformation fromagère lors de l'acidification (pH 4,3-5,5) ou dans les fromages à pâte fraîche (pH 4,3-4,5), alors que la croissance et l'activité d'autres micro-organismes sont stoppées ou ralenties (Desmasures et Beuvier, 2011).

2.1.2. L'activité de l'eau (A_w)

Elle correspond à la quantité d'eau libre dans un milieu, et donc disponible pour le développement des micro-organismes. La valeur théorique de l' A_w peut varier de 0 (milieu totalement sec) à 1 (eau pure). Tous les micro-organismes n'ont pas les mêmes exigences vis-à-vis de l' A_w (rôle par exemple en début d'affinage des fromages). Lorsque les valeurs sont supérieures à 0,95 (cas des pâtes fraîches, des pâtes molles et de certaines pâtes pressées), l' A_w a peu d'effet sur les micro-organismes. En dessous de 0,91 (cas des fromages à pâte dure), la plupart des bactéries voient leur croissance inhibée (Desmasures et Beuvier, 2011).

2.2. La diversité des microorganismes associés aux laits

2.2.1. En termes de genres

Peu de travaux récents ont été consacrés à un inventaire de la diversité microbienne des laits crus. Des données sont disponibles pour des laits de vache, l'étude de **Mallet et al, (2010)** sur 12 exploitations situées en Basse-Normandie ont révélé la présence d'au moins une quarantaine de genres microbiens différents (près de 150 espèces différentes). Ces éléments sont détaillés dans le **Tableau 3 (Mallet et al, 2010 ; Saubusse et al, 2007)**.

Tableau 3. Inventaire de la diversité des bactéries et levures dans du lait, adapté de **(Mallet et al, 2010 ; Saubusse et al, 2007)**

Groupes microbiens	Lait de vache
-Bactéries lactiques	- <i>Aerococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>
-Staphylocoques et bactéries corynéformes	- <i>Arthrobacter</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macroccoccus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Rothia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>
-Levures	- <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Kazachstaniana</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichosporon</i>

2.2.2. Espèces et souches

Dans des laits de vache de la zone AOC Comté, parmi les flores lactiques et propioniques recherchées, six espèces de lactobacilles, trois espèces d'entérocoques et trois espèces de *Propionibacterium* ont été identifiées par **Bouton et al, (2006)**. Plus généralement, les travaux de **Normand et al, (2007)** et de **Bouton et al, (2007)** ont permis de mettre en évidence quarante-neuf espèces bactériennes environnementales différentes dans les laits analysés. **Dalmasso et al, (2008)** se sont intéressés à l'évolution de populations de bactéries lactiques (lactocoques, lactobacilles, leuconostocs et entérocoques) dans le lait cru d'une exploitation, prélevé pendant 12 jours successifs. Dans ce travail, si globalement un nombre plus limité d'espèces a été mis en évidence (7 espèces), l'étude de la diversité intra-spécifique de *Lc.lactis* a révélé 11 groupes de souches distincts, dont deux représentés de façon permanente.

2.3. Rôle de la microflore du lait

La composition microbienne des fromages dépend essentiellement de celle du lait, elle-même dépendante de méta-écosystèmes microbiens, que sont les exploitations laitières dans lesquelles plusieurs systèmes s'imbriquent allant de biofilms de machine à traire à la peau des trayons, en passant par les litières et autres ambiances autour de l'animal. Cette mosaïque de systèmes très divers constitue des réservoirs de biodiversité encore très mal connus et le flux de micro-organismes entre eux, le lait et la croûte des fromages n'est pas encore établi. La diversité et l'évolution de la composition microbienne des fromages au cours de leur affinage naissent aussi de la diversité des conditions environnementales de fabrication (différents types de technologie fromagère) et d'affinage.

2.3.1. Préservation de la diversité microbienne

La préservation in situ par protection des écosystèmes naturels peut s'avérer un des meilleurs garants du maintien de la biodiversité et constituer un terrain d'observation de son évolution. Elle protège la valeur patrimoniale des ressources génétiques et fonctionnelles à la base de la préservation des savoir-faire, même dans un système «boîte noire».

Dans les filières fromagères, elle doit s'appuyer sur la conservation des pratiques traditionnelles qui ont fait leurs preuves : levains naturels, savoir-faire ancestral. Elle prend tout son sens dans les filières sous signes de reconnaissance où le maintien de la biodiversité (Daniel, 2010). Elle doit être raisonnée en se fondant sur une démarche scientifique et en exerçant moins de pression de sélection sur les communautés microbiennes. Ces écosystèmes ainsi préservés constituent des observatoires de biodiversité dont l'évolution structurelle et fonctionnelle pourra être suivie par les indicateurs évoqués et mise en relation avec les bénéfices attendus sur les qualités des produits laitiers.

La conservation du patrimoine microbien passe aussi par leur préservation ex situ, tâche difficile lorsqu'on veut préserver toute la diversité. Elle ne peut exister et continuellement s'enrichir qu'au travers du maintien in situ de la biodiversité. Les centres de ressources biologiques (CRB) s'inscrivent dans cette logique en s'efforçant de préserver en collection les ressources biologiques, de caractériser leurs potentialités pour une exploitation future, de constituer des banques d'acides nucléiques. Plus spécifiquement,

une stratégie a été mise en place au niveau français pour la préservation ex situ du patrimoine microbien des produits laitiers. La sauvegarde des écosystèmes naturels, en attendant de mieux les connaître et/ou dans l'idée d'avoir une réserve biologique pour faire face à des accidents (phages) ou pour répondre à de nouveaux besoins, a été adoptée par certaines AOC qui ont constitué des banques de flores.

2.4. Evolution de la microflore du lait dans les fromages

2.4.1. Prédominance de la microflore du lait dans la pâte du fromage au cours de l'affinage

Au cours de la fabrication du fromage au lait cru, la microflore naturelle du lait subit des stress plus ou moins nombreux et éprouvants (acidification, égouttage, chauffage...) selon la technologie de fabrication mise en œuvre. De plus, dans le but d'obtenir une acidification correcte et un égouttage suffisant, le fromager procède généralement en début de fabrication à un ensemencement lactique que l'on peut considérer comme massif (plus de 10^6 UFC/ml de lait de fabrication) en regard de la microflore naturelle du lait (moins de 10^5 voire moins de 10^4 UFC/ml). Ce déséquilibre des populations s'accroît encore au cours de la fabrication, toujours au profit des bactéries lactiques qui se développent et assurent l'acidification du caillé. Ainsi, au moment du démoulage des fromages, on obtient des niveaux de bactéries lactiques acidifiantes proches de 10^8 à 10^9 UFC/g de caillé contre moins de 10^4 UFC/g de caillé pour la microflore naturelle du lait. Ainsi, on pourrait penser que la microflore naturelle du lait subit une telle compétition microbienne qu'elle se trouve très minoritaire pour prétendre jouer un rôle pendant l'affinage. Pourtant, on la retrouve dans les fromages en cours d'affinage **Agabriel et al, (1999)** et elle joue un rôle très important sur les caractéristiques finales du fromage. Par exemple, la flore lactobacille mésophile hétérofermentaire, pourtant minoritaire au moment du démoulage, est capable de se développer dans les fromages au cours de l'affinage et d'atteindre des niveaux de population suffisants pour prétendre jouer un rôle dans l'évolution biochimique des fromages.

Par exemple, en Comté, fromage à pâte cuite pressée fabriqué au lait cru de vache, **Grappin et al, (1999)** ont montré que les microflores lactiques acidifiantes streptocoques et lactobacilles thermophiles, largement dominantes au démoulage (10^8 UFC/g) ont une population qui décroît pendant les premières semaines d'affinage. A l'inverse, deux

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

microflore naturelle du lait lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et bactéries propioniques se développent rapidement pour devenir majoritaires dès 4 à 8 semaines d'affinage. Ces dynamiques ont été observées sur un ensemble de 20 fromages issus de 5 fromageries et ont pu être confirmées ensuite par d'autres travaux (Bouton et al, 2009). Cependant, les auteurs notent qu'une partie de la microflore naturelle du lait se développe peu ou pas dans la pâte du Comté en cours d'affinage ; c'est le cas par exemple des entérocoques, lactocoques, coliformes...

D'autres dynamiques de populations microbiennes ont aussi été observées en Salers, fromage à pâte pressée au lait cru de vache (Callon et al, 2005). Les microflore naturelles du lait ou issues de la gerle en bois servant à la fabrication, telles que leuconostocs, lactobacilles mésophiles hétérofermentaires mais aussi levures, croissent au cours de l'affinage ; cependant seules les deux premières populations atteignent 10^6 UFC/g et prennent donc une place importante dans l'écosystème microbien du fromage. Les leuconostocs ont, quant à eux, une place plus variable dans l'écosystème du fromage et d'autres flores, comme précédemment, restent présentes sans être dominantes (entérocoques, lactocoques).

Dans les fromages à pâte molle et affinage court, des constats similaires ont aussi été faits. Ainsi, dans des Camemberts issus de 3 fromageries, Dubernet et al, (2008) ont mis en évidence, dès 14 jours d'affinage, la présence importante (10^6 à 10^9 UFC/ g) de lactobacilles hétérofermentaires (*Lactobacillus paracasei*, *plantarum*...), en été comme en hiver. Néanmoins, les dynamiques de ces populations pendant l'affinage varient selon les fromageries étudiées. Il faut relativiser l'impact relatif de ces flores dans ces fromages. En effet, le rapport surface/volume de ces produits est élevé, donnant un rôle très important à la flore de surface. La biomasse correspondant à ces micro-organismes et l'activité de ces flores anaérobies est probablement faible comparée à celle des flores aérobies qui se développent à la surface (comme *P. camemberti* par exemple). Cependant, cette microflore anaérobie, qui a été peu étudiée et dont les métabolites aromatiques restent dans la pâte, mériterait sans doute plus d'intérêt.

2.5. Microflore du lait et bénéfices potentiels pour la santé

2.5.1. Lait/microflore du lait et allergies

Des études ont montré que les enfants qui vivaient dans les pays ou régions les plus «développées» avaient plus de risques de développer des maladies allergiques ; à l'inverse, les enfants qui avaient vécu leurs premières années de vie dans un environnement «traditionnel» rural étaient en quelque sorte «protégés» contre l'allergie et l'asthme (Vuitton et Dalphin, 2006 ; Bieli et al, 2007). Tout en confirmant les résultats généraux sur la protection de l'environnement de la ferme contre la survenue de manifestations atopiques, Riedler et al, (2001) ont montré que l'exposition à l'ambiance des étables et la consommation de lait cru étaient indépendamment et de façon synergique associée à des prévalences d'asthme (0,8 vs 11,8 %), de rhume des foins (0,8 vs 16 %) et de sensibilisation atopique (8,2 vs 32,9 %) significativement plus basses que celles observées chez les enfants non exposés. Ainsi l'exposition aux micro-organismes dans la prime enfance (première année de la vie) préviendrait des désordres atopiques (allergies). Cependant, plusieurs études semblent indiquer que l'exposition plus tardive pourrait aussi jouer un rôle, et que la protection serait d'autant plus importante que cette exposition se prolonge tout au long de la vie. La période foetale elle-même pourrait être également déterminante, car le fait que la mère ait vécu dans une ferme pendant sa grossesse, mais aussi qu'elle ait bu du lait cru pendant cette période, est significativement associé à la protection de son enfant vis-à-vis des maladies allergiques (Vuitton et Dalphin, 2006).

En plus du contact avec les animaux de la ferme et avec des composés microbiens comme les lipopolysaccharides (LPS) : endotoxines, composants des bactéries à Gram négatif, la consommation du lait a été identifiée comme un autre facteur caractéristique de la vie «à la ferme» pouvant conférer une protection contre les allergies (Riedler et al, 2001 ; Wickens et al, 2002 ; Perkin et Strachan, 2006 ; Waser et al, 2007). Les composants responsables de l'effet protecteur du à la consommation de lait de ferme et les mécanismes biologiques impliqués ne sont pas encore clairement identifiés bien que quelques suggestions aient été formulées. Ainsi, les lactobacilles (viabiles) et les LPS (non viabiles) du lait de ferme interagissant directement ou indirectement (par exemple via la modification de la microflore intestinale) avec le système immunitaire ont été proposés comme facteurs possibles de causalité. De même, Debarry et al, (2007) ont montré que des bactéries abondantes dans l'étable comme *Lactococcus lactis*, bactérie lactique

présente également dans le lait cru, avaient un effet protecteur chez la souris contre le développement d'une maladie allergique telle que l'asthme. Ainsi comme discuté par **Perkin, (2007)**, l'effet protecteur du lait cru ou non pasteurisé est-il dû à une quantité plus importante et/ou à une diversité de micro-organismes présents dans ce lait ?

Par ailleurs, des composants du lait de ferme autres que les micro-organismes, tels que des quantités élevées d'acides gras polyinsaturés (omega-3), pourraient également jouer un rôle (**Perkin et Strachan, 2006 ; Bieli et al, 2007**). Des études épidémiologiques menées par **Waser et al, (2007)**, dans lesquelles entre autres, la consommation de beurre comparée à celle de la margarine a été associée à un risque plus faible d'apparition de l'asthme, confirmeraient un rôle potentiel de l'ingestion d'acides gras associée à la consommation de lait de ferme dans la diminution de l'allergie.

Des études toutes récentes semblent confirmer ou infirmer les résultats précédemment obtenus. Ainsi, selon **Gehring et al, (2008)**, l'effet «vie à la ferme» et l'effet protecteur de la consommation de lait de ferme ne peuvent pas être expliqués par des niveaux plus élevés d'endotoxines (composants présents chez les bactéries à Gram négatif) dans le lait des familles vivant à la ferme comparées à celles n'y vivant pas et dans le lait de ferme comparé à du lait acheté dans le commerce, respectivement. Par ailleurs, **Pfefferle et al, (2010)**, tout en confirmant les effets protecteurs contre l'allergie de la «vie à la ferme» et de la consommation de produits laitiers issus de la ferme, suggèrent un rôle de la matière grasse du lait. En effet, ils ont observé dans le sang du cordon ombilical des futures mamans vivant à la ferme et consommant du beurre fermier une plus grande quantité de composés médiateurs d'une réponse immunitaire favorisant ultérieurement chez le jeune enfant une protection contre l'allergie atopique. De manière intéressante, ces auteurs soulignent l'importance des procédés de transformation du lait de ferme dans le rôle protecteur des produits laitiers issus de la ferme.

2.6. Les flux microbiens à la ferme

La connaissance des réservoirs de flores et des flux de microorganismes existants dans les étables et les salles de traite semble un préalable indispensable pour mieux appréhender l'influence des pratiques de production dans l'enrichissement des laits en flore d'intérêt technologique. Les microorganismes retrouvés dans le lait à la ferme peuvent avoir de multiples sources. Ils peuvent provenir de l'environnement des animaux

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

(bâtiment, eau d'alimentation du bétail, fourrages...), des animaux eux-mêmes et de leurs déjections, du matériel de traite, du trayeur... Selon une étude de Normand et al, (2007), réalisée dans 16 fermes bovines de Franche-Comté, sur le cheminement des microorganismes depuis l'étable jusqu'au lait a montré que la majorité des espèces bactériennes, recensées dans le lait, avait pour origine l'environnement de la salle de traite (air, nourriture utilisée pendant la traite, trayons). De plus, la mise en évidence de souches de la même famille, entre des bactéries isolées du lait et celles isolées de l'environnement (aliments, poussières, trayons, manchons) tendait à montrer l'existence de flux microbiens depuis l'environnement de la ferme jusqu'au lait (Bouton et al, 2007). Sur la Figure 2 sont représentées les sources potentielles de micro-organismes et leurs trajectoires possibles jusqu'au tank à lait. Si la littérature est assez bien fournie sur les contaminations du lait par les bactéries pathogènes ou d'altération (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*...), peu d'études sont disponibles sur les réservoirs et les voies d'ensemencement du lait en flore d'intérêt technologique.

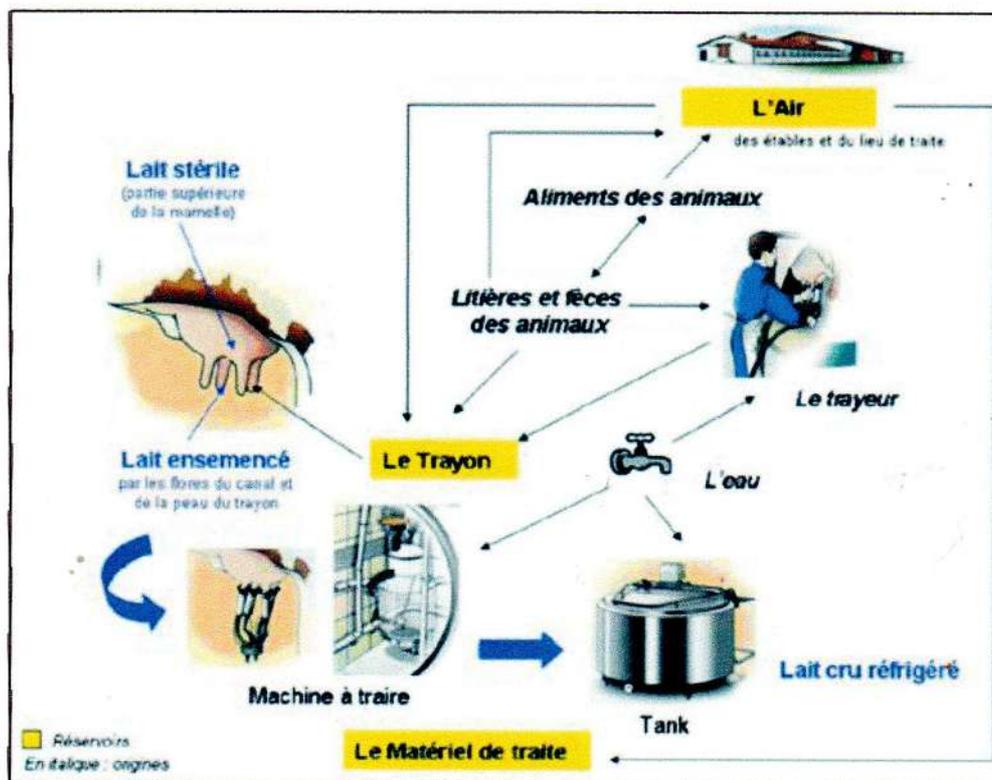


Figure 2. Flux microbiens dans les étables de production laitière

2.6.1. Le réservoir trayon : sa composition et les pratiques influentes

Les flores présentes en surface des trayons sains sont majoritairement des flores d'intérêt fromager : flores acidifiantes, entérocoques, flores intervenant lors de l'affinage. Les flores indésirables d'altération y sont détectées également mais en quantité cent fois moindre.

Les prélèvements réalisés en surface des trayons sont effectués le plus souvent par frottis au moyen de lingettes stériles pré-humidifiées. Les surfaces prélevées correspondent aux extrémités des trayons qui se trouvent plus tard en contact avec le manchon, sans oublier les sphincters. Les prélèvements ont lieu le plus souvent au moment de la traite, juste avant que les animaux soient nettoyés. Les données les plus nombreuses sur la charge microbienne présente en surface de trayons avant préparation concernent la vache laitière (**Desmaures et al, 1997b ; Joandel, 2007 ; Michel et al, 2006**).

Les résultats obtenus ont montré que :

- ❖ Il existe une large variété de groupes microbiens présents en surface des trayons.
- ❖ Les flores d'intérêt fromager sont largement dominantes dans la population globale, et ce, quelles que soient les espèces étudiées.

2.6.1.1. La variabilité des flores microbiennes en surface des trayons

La charge microbienne présente en surface des trayons est associée à la saison : elle est globalement plus faible en été. Elle dépend également des conditions de logement des animaux : la propreté et la nature des litières (paille ou sciure) influent son niveau et sa composition.

2.7. Les facteurs liés à l'environnement des animaux

Les niveaux et la qualité de la flore microbienne présente en surface de trayons sont principalement associés aux conditions dans lesquelles évoluent les animaux : les litières par leur composition et leur degré d'entretien semblent l'un des points majeurs associés à la variabilité de cette charge microbienne. L'un des premiers facteurs de variabilité est le facteur saison, les surfaces des trayons étant globalement moins chargées en saison estivale qu'hivernale. Ainsi, les niveaux des flores d'intérêt fromager tels que ceux de la flore

acidifiante mésophile, des entérocoques, de la flore halophile (composée majoritairement de microcoques et corynebactéries) ou encore des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont présents en quantité 4 fois supérieure en hiver pour les mêmes troupeaux prélevés en été et en hiver (30 troupeaux), alors que les flores d'altération (coliformes, *Clostridium* spp.) recherchées dans ces exploitations n'ont pas montré de différences de niveaux significatives.

Un des autres facteurs associé à la charge microbienne présente en surface des trayons est la qualité de la litière. En effet, son degré de souillure est inversement lié à la charge microbienne des trayons pour des troupeaux passant la nuit sur une litière en période hivernale (GIS Alpes du Nord, 2009). Des corrélations existent par ailleurs entre les niveaux de certains groupes microbiens présents dans les litières et leurs niveaux en surface des trayons : c'est le cas des niveaux de Flore Mésophile Anaérobie Revivifiables (FMAR), de flores acidifiantes mésophiles, d'entérocoques et de levures. La comparaison entre la charge microbienne des trayons de vaches laitières prélevée à la traite du matin ou du soir semble montrer une présence plus importante de germes en surface des trayons le matin que le soir mais cette différence reste faible en bovins.

2.8. Le réservoir machine à traire : sa composition et les pratiques influentes

2.8.1. Des biofilms présents à la surface de la machine

De nombreux micro-organismes ont la faculté d'adhérer aux surfaces. Ce phénomène, suivi d'une multiplication des cellules adhérentes dans un environnement riche en minéraux et en matières organiques, conduit à la formation d'un biofilm. Il s'agit de communautés microbiennes immobilisées sur une surface et souvent enfouies dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires (Carpentier et Cerf, 1993). La formation de biofilms par les microorganismes est un phénomène très commun. La majorité des matériaux en contact avec un fluide naturel peut rapidement être recouvert des bactéries (Prigen-Combaret et al, 1999). C'est le cas des surfaces humides des équipements laitiers tels que la machine à traire (Devoyod et al, 1987 ; Carpentier et Cerf, 1993 ; David et Huet, 2001).

2.9. Dans les exploitations bovines

Les groupes microbiens mobilisés par rinçage de la machine à traire dans des exploitations de Savoie ne sont pas très diversifiés (**Michel et al, 2005a et 2006**). Sur les douze groupes microbiens recherchés, seuls quatre ont été isolés et dans 80% des cas, avec des niveaux relativement faibles (<100 UFC/ml d'eau). De plus, les flores d'altération (coliformes et *Pseudomonas*) ont été retrouvées la plupart du temps à des niveaux identiques à ceux des flores d'intérêt technologique. Dans certains cas, une mobilisation importante de germes (élévation d'un facteur 1 000 de la population microbienne de l'eau utilisée pour le rinçage) a été observée.

2.10. Microorganismes utilisés dans l'industrie laitière

2.10.1. Bactéries lactiques de lait

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli. Ce sont des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples (fermentation lactique). Elles ont pour rôles essentiels d'acidifier le lait et le caillé, de participer à la formation du goût (protéolyse, production d'arômes), de la texture et de l'ouverture des produits laitiers (**Badis et al, 2005**).

2.10.1.1. Type de bactéries lactiques

- ❖ **Les bactéries lactiques Homofermentaires** : Ce sont des bactéries fermentant le lactose en produisant uniquement de l'acide lactique (Lactose, Glucose, acide lactique, Galactose).
- ❖ **Les bactéries lactiques Hétérofermentaires** : Les métabolites résultants de la fermentation du lactose sont de l'acide lactique, divers acides ; et du CO₂. Cette particularité entraîne la formation de bulles de gaz emprisonnées dans le coagulum, responsables de la formation de trous visibles, dans le caillé ou le fromage.
- ❖ **Les bactéries lactiques Mésophile** : Les coliformes et les pathogènes sont les mésophiles les plus importants à prendre en compte dans l'industrie laitière.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les autres mésophiles de la flore banale ont peu d'importance de par leurs faibles incidences sur les produits laitiers. Les coliformes peuvent fermenter le lactose pour produire de l'acide lactique, acétique, succinique et formique. Ces acides ont une incidence sur le pH du lait. Les coliformes peuvent également produire, dans certaines conditions, des composés alcooliques tels que le butane diol et l'alcool éthylique ainsi que des gaz, notamment le CO₂ et l'hydrogène, pouvant être responsables du gonflement ou de l'effritement des fromages. Enfin, ils peuvent conférer certaines saveurs désagréables aux produits laitiers (Vignola, 2002). Ceux sont des bactéries dont la température optimale de multiplication se situe entre 20 et 30°C. Mais la multiplication est possible entre 10 et 35°C. Dans la maturation des laits, il est courant de mesurer une activité fermentaire des levains fermiers placés à une température de 12°C pendant 12 h se traduisant par une acidification d'environ 10 °D (on appelle cette phase un pré maturation).

- ❖ **Les bactéries lactiques Thermophiles :** Dans l'industrie laitière, le terme bactéries thermophiles fait référence aux microorganismes qui croissent dans le lait ou dans d'autres produits laitiers main tenus à une température élevée, soit de 55°C ou plus. Ne pouvant croître à des températures inférieures à 40°C, ils ne constituent pas une préoccupation majeure dans le domaine laitier. Toutefois, étant donné que les principales souches thermophiles proviennent de l'ensilage, du sol et d'un manque d'assainissement du pis de la vache, un compte élevé en thermophiles pourra être un indice d'un manque d'hygiène à la ferme (Vignola, 2002). Ceux sont des bactéries dont la température optimale de multiplication se situe entre 40 et 60°C. Toutefois, la multiplication est possible entre 25 et 60°C.
- ❖ **Les bactéries lactiques Psychotropes :** sont des microorganismes très importants dans l'industrie laitière en raison de leur faculté à pouvoir croître entre 0 et 4°C. Cette plage de températures correspond à celle qu'on recommande pour la conservation du lait (Vignola, 2002). Ceux sont des bactéries mésophiles capables de se multiplier à une température inférieure à 7°C, mais avec des temps de génération longs. Exemples: *Listéria monocytogenes*. *Pseudomonas Fluorescens* et certains coliformes.

2.10.2. Levures

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, souvent plus grandes que les bactéries, de forme ovoïde ou sphérique (1 à 5 micromètres de large sur 5 à 30 micromètres de long). Certaines levures croissent sous forme de filaments mais la plupart bourgeonne puis se scinde en deux cellules filles. La majorité d'entre elles appartient au groupe Eumycètes Ascomycètes. La levure étant eucaryote, son matériel génétique est composé de 16 chromosomes linéaires, situés dans le noyau.

Les levures ont aussi la capacité de se développer aussi bien en aérobie qu'en anaérobie. En aérobie les cellules effectuent une glycolyse classique et ont une forte vitesse de croissance tandis qu'en anaérobie elles effectuent la fermentation alcoolique, qui est bien moins rentable énergiquement mais conduit à la formation d'un sous-produit intéressant pour l'Homme : l'éthanol. Dans le cadre d'une fermentation, la levure utilise le sucre du milieu extérieur, ainsi leur culture peut se faire sur n'importe quel milieu glucosé, notamment le BCP (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol). Ce milieu change de couleur lorsqu'il y a fermentation et l'incubation dure 24 à 48h à 28°C.

Actuellement il existe une dizaine de levures utilisées dans différentes industries. Les levures *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis* et *Saccharomyces bayanus* sont aussi utilisées dans les industries alimentaires pour le lait.

2.10.3. Moisissures

Les moisissures sont caractérisées par leur appartenance aux micromycètes filamenteux, elles sont donc pluricellulaires. Les filaments sont plus ou moins ramifiés et ces structures forment des hyphes. L'ensemble des hyphes constitue le mycélium. Les moisissures sont des organismes qui, pour se développer, requièrent des conditions de culture peu exigeantes, **Tableau 4, (Lucile et al, 2016).**

- ❖ **Température** : en général la croissance est possible entre 4 et 30°C, l'optimum se situant entre 18 et 28°C.
- ❖ **pH** : L'optimum se situe entre 4 et 6,5, mais elles ont possibilité de coloniser des milieux très acides (pH = 2) via des moisissures acidophiles, mais aussi basiques (jusqu'à pH = 11).
- ❖ **A_w** : certaines moisissures peuvent supporter une activité de l'eau de 0,2-0,3.
- ❖ **Oxygène** : elles ont la capacité de se développer dans une fourchette très large (de

l'air ambiant jusqu'aux produits comportant uniquement des traces d'oxygène).
Néanmoins, les moisissures ne se développent pas en anaérobie.

Tableau 4. Exemple d'utilisations des principales moisissures retrouvées en alimentaire
(adapté de Lucile et al, 2016)

Espèces	Utilisation
- <i>Penicillium roqueforti</i>	-Fromages à pâte persillée
- <i>Penicilium camembert</i>	-Fromages à croûte fleurie
- <i>Penicilium nalgiovensis</i>	-Flore de surface du saucisson, fromages d'Ellischauser (semblable au camembert)
- <i>Penicillium album</i>	-Flore de surface du saucisson, couverture de certains fromages
- <i>Geotrichum candidum</i>	-Affinage des fromages, fabrication de gari (condiment japonais)
- <i>Mucor</i>	-Flore de surface de certains fromages, transformation de produits divers

Ces micromycètes sont capables de produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques (lipases et protéases), elles sont donc retrouvées en industries alimentaires, notamment dans les procédés d'affinage et de transformation des produits (particulièrement *Penicillium*). Les moisissures sont donc intégrées dans les procédés de fabrication des fromages.

2.10.4. La fermentation et l'aptitude fermentaire du lait

La fermentation lactique est l'étape centrale du procédé de fabrication des laits fermentés. Elle correspond à la transformation du lactose du lait en acide lactique, sous l'action de micro-organismes spécifiques appelés bactéries lactiques. Elle s'accompagne de modifications biochimiques, physico-chimiques et sensorielles du produit. La principale conséquence de la fermentation lactique est d'augmenter la stabilité du produit, par inhibition des altérations microbiennes et enzymatiques éventuelles, et donc d'allonger sa durée de conservation. Elle confère également au produit des propriétés nutritionnelles et organoleptiques particulières (saveur, texture, arômes).

2.10.4.1. Les ferments lactiques

Les ferments lactiques représentent une grande famille de micro-organismes, au sein de laquelle figurent notamment des bactéries lactiques et des levures lactiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Comme leur nom l'indique, ces micro-organismes sont impliqués dans la fermentation lactique. Il existe différents ferments lactiques mais les principaux sont les bactéries lactiques. Elles ne sont pas visibles à l'œil nu. Par microscopie, les scientifiques les classent parmi les bactéries à Gram positif (Gram⁺). Cela signifie qu'elles disposent d'une paroi très épaisse.

A l'origine, les ferments lactiques étaient récupérés au sein de produits fermentés puisensemencés pour être utilisés dans d'autres fermentations. Toutefois, ce procédé n'est aujourd'hui plus suffisant pour couvrir la demande croissante tant pour l'industrie agroalimentaire que nutraceutique. Grâce aux progrès de la science, des souches de ferments lactiques ont pu être isolés puis mises en culture pour une production à plus grande échelle.

Il faut savoir qu'il existe différentes souches de bactéries lactiques, parmi lesquelles figurent notamment les *Lactobacillus*, les *Lactococcus*, les *Aerococcus*, les *Alloiococcus*, les *Enterococcus* et les *Streptococcus*. Malgré quelques débats, les bifidobactéries (*Bifidobacterium*) sont également souvent classées parmi les bactéries lactiques. De fait, il est possible de distinguer trois catégories de ferments lactiques : Les ferments purs qui se composent d'une seule souche ; les ferments mixtes qui regroupent différentes souches dont la composition est partiellement déterminée ; les ferments mixtes sélectionnés qui se composent de plusieurs souches bien définies. Les ferments purs et les ferments mixtes sélectionnés sont notamment utilisés pour l'élaboration de compléments alimentaires.

2.10.4.2. Les ferments du commerce

Pour une bonne maîtrise de la fabrication des fromages, il est vivement conseillé d'utiliser des ferments lactiques du commerce. Le bon choix et le bon emploi de ces ferments lactiques conduisent à une meilleure maîtrise de la fabrication des fromages.

Cette maîtrise se matérialise par une acidification contrôlée du lait avec un impact sur la coagulation du lait et l'égouttage du caillé, et sur la fabrication des fromages. Selon les ferments, ceux-ci peuvent, de plus, avoir un rôle plus ou moins important sur l'aromatisation et la texture des fromages et, par voie de conséquence, sur l'affinage. Il convient en fonction de la technologie fromagère et des objectifs recherchés de choisir le ou les ferments lactiques le ou les mieux appropriés.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Les ferments lactiques aromatiques «MCLARCH»** : Ces ferments sont adaptés à toutes les technologies fromagères : pâtes fraîches (fromages blancs), pâtes molles et tout particulièrement pour les fromages au lait de chèvre et de brebis. La présence dans leur composition de souches de *diactetylactis* et de *cremoris* en fait un ferment adapté à la maturation des crèmes et à la fabrication du beurre. Compte tenu de leur qualité aromatique, ils peuvent être utilisés comme ferments d'appoint en pâte pressée et pâte pressée cuite.
- ❖ **Les ferments acidifiants mixtes thermophiles «NZE»** : Ces ferments conviennent pour les technologies fromagères mixtes: pâtes molles stabilisées et pâtes pressées non cuites. La présence de souches aromatiques mésophiles conduit à l'obtention de fromages plus riches en arômes.
- ❖ **Les ferments «NSB»** : Composés de *Streptocoques* thermophiles et de *Lactocoques bulgaricus* sont recommandés pour la production de pâtes pressées non cuites, voire en technologie pâte molle stabilisée.
- ❖ **Les ferments «NT» (Lactocoques lactis)** : Ces ferments peuvent être utilisés pour toute technologie fromagère du fait de leur pouvoir acidifiant. Mésophiles (*Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp ecremosis*).
- ❖ **Les ferments «YOYO»** : sont destinés à la production de yaourts, il s'agit d'un mélange de *Streptocoques* thermophiles et de *Lactocoques bulgaricus* destiné à la fabrication de succulents yaourts. L'ensemble de ces cultures est présenté sous forme lyophilisée pour ensemencement direct dans le lait de fabrication. Un sachet dosé à 0,5 unité est adapté pour un volume de lait de 20 litres à 80 litres. Ils peuvent également être utilisés en semi-direct. Il existe selon les ferments 2 à 3 rotations.

2.10.4.3. Les ferments naturels (Flore indigène)

Le lait contient peu de microorganisme lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml) (Guiraud, 1998). Cette flore se définit comme l'ensemble des microorganismes qui se retrouvent dans le lait à la sortie du pis, il devrait contenir moins de 5 000 UFC/ml, les principales flores sont *Micrococcus* 30-90%, *Lactobacillus* 10-30%, *Streptococcus* et *Lactococcus* < 10% (Vignola, 2002).

2.11. Caractérisation du caillage en fromagerie

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel des caséines du lait. Cette déstabilisation peut être réalisée de deux manières :

- ❖ Soit par voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques contenues dans la flore indigène du lait et/ou apportées sous forme de ferments.
- ❖ Soit par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure.

Les mécanismes d'action impliqués lors de la coagulation par voie fermentaire ou enzymatique sont très différents au niveau de la micelle de caséine. Bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un caillé, les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation (**Vignola, 2002**).

Dans les techniques fromagères classiques, les deux modes de coagulation ne sont pas utilisés séparément, la coagulation est en fait mixte. Seule varie l'importance relative de la coagulation acide et de la coagulation enzymatique. Les fromages de type pâtes fraîches (fromages blancs, faisselles) et pâtes molles à caractère lactique (Epoisses, Maroilles, Camembert traditionnel) ont une coagulation à caractère mixte mais à large dominante acide, alors que d'autres fromages à pâte molle comme le Pont l'Evêque subissent au contraire une coagulation à dominante enzymatique, voir le **Tableau 5**.

Tableau 5. Comparaison entre les deux modes de coagulation
Source (<https://laboxfromage.fr/blog/presure-fromage/>)

	Avec présure	Avec ferments lactiques
-Nom du caillé	-Présure	-Lactique
-Texture	-Ferme et élastique	-Fragile et humide
-Solidification	-Rapide	-Lente
-Particularité	-Se conserve plus longtemps d'origine animale	-Mobilise des microorganismes
-Action	-Enzymatique	-Fermentaire
-Exemple de fromages	-Comté, Gruyère ...	-Camembert, Chaource...

- ❖ **La coagulation acide :** Le mécanisme de la coagulation par voie fermentaire aussi dite coagulation acide est de nature électrochimique et induit par les ferments lactiques. Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuco nostoc*, et

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Streptococcus sont les plus utilisés tout en variant en fonction des fromages et des technologies. Le Camembert présente par exemple une majorité de *Lactococcus*, et seuls les laits fermentés par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* peuvent prétendre à l'appellation yaourt. La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose pour produire de l'acide lactique. Ce dernier est libéré lors de la croissance des microorganismes et neutralise progressivement les charges électronégatives des caséines κ . La répulsion électrostatique entre les micelles de caséine diminue au fur et à mesure de l'enrichissement du milieu en ions H^+ , puis disparaît provoquant ainsi un rapprochement et une agrégation des micelles de caséine.

- ❖ **La coagulation enzymatique du lait** : Elle est souvent le processus majoritaire de coagulation des fromages à pâte pressée cuite comme le Comté ou le Beaufort. En effet pour ces fromages on ajoute plus d'extraits coagulants que pour les fromages à pâtes molles.
- ❖ **L'extrait coagulant** : La dénomination «présure» est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage. De nos jours on l'utilise toujours en technologie fromagère, principalement sous forme liquide ou en poudre. La présure provient du quatrième estomac (la caillette) des vaches et autres jeunes ruminants : c'est un coagulant du lait composé d'enzymes actives, la chymosine et la pepsine.

Chapitre III

CHAPITRE III : Aptitude fermentaire

3.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation, **Tableau 6 (Sylvie et al, 2004)**. Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés (**Larpen, 1997**).

Tableau 6. Caractéristique des espèces bactériennes dans l'industrie Laitière (**Sylvie et al, 2004**)

Espèces bactériens	Caractéristique (variable selon la souche)
Homofermentaires mésophile :	
- <i>Lactococcus lactis ssp. lactis Lactococcus lactis var. diacetylactis</i>	-Acidifiante et rapide, sensible aux phages Moins rapide, aromatisant, gazogène, sensible aux phages.
- <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	-Plus ou moins acidifiante, plus ou moins rapide, moins sensible aux phages.
Hétérofermentaires stricts mésophiles :	
- <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. Cremoris</i>	-Aromatisant, gazogène.
- <i>euconostoc mésenteroides ssp. mesenteroides</i>	-Plus gazogène.
Homofermentaire thermophiles :	
- <i>Streptococcus thermophilus</i>	-Moins acidifiante, plus rapide, ne fermente pas le galactose.
- <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i>	-Plus acidifiante, plus ou moins rapide, ne fermente pas le galactose.
- <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Lactis</i>	-Plus acidifiante plus lente, moins protéolytique, moins thermosensible, plus résistante au lysozyme Plus ou moins acidifiante, plus lente, plus protéolytique.
- <i>Lactobacillus helveticus</i>	-plus thermorésistante, plus ou moins résistante au lysozyme.

3.1.1. Facteurs microbiologiques influençant le métabolisme des bactéries lactiques

Le choix des souches est crucial pour l'obtention des spécificités de chaque produit. Ce choix se fait en fonction des fonctionnalités de chaque souche (acidification, production d'arômes, aptitude-texturant, post-acidification), au regard du cahier des charges établi pour le produit fini.

Le taux d'ensemencement des bactéries lactiques dans le lait influence fortement sa transformation. Plus il est élevé, plus la fermentation est rapide. Généralement, ce taux se situe autour de 10^6 UFC/ml (UFC : unités formant colonie) pour, simultanément, obtenir des durées de fabrication courtes et limiter le coût d'achat des ferments. Pour un ensemencement direct, cela correspond à un taux d'inoculation compris entre 2,5 g et 70 g de ferments pour 100 L de lait selon les espèces bactériennes considérées.

Les équilibres de population agissent également sur les cinétiques microbiennes et la post acidification. Dans le cas de la fabrication du yaourt, la durée de la fermentation varie selon la valeur initiale du rapport entre streptocoques et lactobacilles, même si, en fin de culture, les streptocoques sont pratiquement toujours majoritaires. Ce rapport est défini soit, par le producteur de ferments en vue de l'élaboration des mélanges de souches destinées à l'ensemencement direct soit, par le fabricant de laits fermentés.

Les bactéries lactiques sont sensibles aux bactériophages qui proviennent généralement du lait cru ou de l'environnement dans l'usine et qui provoquent une lyse des cellules, ralentissant ou empêchant la fermentation. Lors d'une infection phagique, la gélification du lait est perturbée et c'est la production entière qu'il convient de détruire. Une décontamination complète des locaux et des matériels est alors nécessaire. Les bactéries thermophiles sont moins lysogènes que les bactéries mésophiles. Toutefois, *Streptococcus thermophilus* est plus sensible que *Lactobacillus bulgaricus* (Catherine et Sandra, 2019).

Indispensables aux transformations laitières, car au cœur des processus d'acidification et de nombreuses aptitudes technologiques d'intérêt, les bactéries lactiques peuvent également constituer de redoutables micro-organismes d'altération quand leur présence ou leurs propriétés métaboliques ne sont pas souhaitées. Ainsi, la production d'exopolysaccharides (EPS) par certaines souches de streptocoques, de lactocoques ou de lactobacilles, peut être souhaitée pour les yaourts, mais considérée comme un défaut

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

majeur pour certains fromages ou produits laitiers frais (crème de fromage, lait fermenté, pâtes molles). En effet, comme pour les levures et les moisissures, ce qui est favorable pour une technologie laitière peut être indésirable pour une autre. L'altération des fromages la plus souvent corrélée aux bactéries lactiques concerne la production de gaz et la production, par les espèces hétérofermentaires strictes ou facultatives (lactobacilles, *leuconostocs*, etc.), de métabolites au goût et/ou à l'odeur désagréable(s). Ces métabolismes sont d'ailleurs favorisés après les fermentations lactiques incomplètes (acidification défectueuse, attaque phagique, technologie et/ou ferments inadaptés, relargage important de galactose, etc.) et par les températures d'affinage hautes ($> 8^{\circ}\text{C}$), ce qui est le cas pour un grand nombre de fromages. D'autres voies métaboliques, et en particulier le catabolisme des acides aminés des NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria), peuvent également être une source d'altération fromagère (production de gaz, en particulier). Enfin, certains lactobacilles, comme *L. helveticus*, peuvent cataboliser la tyrosine en métabolites colorés (de rose à brun), et dégrader en conséquence l'aspect visuel des fromages affinés.

Parmi les autres bactéries lactiques soupçonnées d'être à l'origine de défauts d'odeur et de goût importants, les entérocoques et en particulier l'espèce *Enterococcus faecalis*, se retrouvent fréquemment cités dans la littérature (Zagorec et Christicans, 2013).

3.1.1.1. Le pH

D'une manière générale, l'abaissement du pH augmente l'activité des protéases coagulantes (qui sont des protéases acides) et diminue l'énergie potentielle de répulsion qui fait que le début de l'agrégation se produit à un taux d'hydrolyse de la caséine κ plus faible. De plus, cette baisse de l'énergie potentielle de répulsion liée à l'acidification se traduit, pour un même taux d'hydrolyse, par un accroissement de la vitesse d'agrégation. Ce temps d'agrégation raccourci se traduit par un temps de gélification réduit et une vitesse de raffermissement du gel accrue. L'augmentation de la solubilisation du phosphate de calcium micellaire due à l'acidification, favorise dans un premier temps (jusqu'à pH 5,8 à 6,0) l'organisation des micelles (par augmentation de Ca^{++}) et accroît la fermeté du gel. En dessous de ces pH, la fermeté est rapidement dégradée par de structuration des micelles. Concernant les aspects pratiques, le pH de 5,8-5,9 correspond, sur un lait de vache non enrichi en protéines, à la demi-solubilisation du phosphate de calcium colloïdal inorganique des nano clusters. C'est à ces valeurs (voire légèrement en dessus, pH 5,9 à

6,0) où la fermeté des gels est maximale, que sont traditionnellement moulés à la louche les camemberts, et à la pelle les bries de Meaux...

Le pH optimal d'hydrolyse de la caséine κ est voisin de 5,5. La pepsine commence à être réellement active en dessous de pH 6,5 et a un pH optimal nettement inférieur à celui de chymosine (pH 2-3). En conséquence, l'abaissement du pH d'emprésurage augmente beaucoup plus l'activité pepsine que celle de la chymosine.

À même dénomination commerciale légale et activité IMCU ou concentration en chymosine active par litre (mg/l), deux lots de présure (provenant d'un même fournisseur, ou de fournisseurs différents) peuvent donner des écarts de comportement technologique (coagulation-affinage) d'autant plus importants que le pH d'emprésurage se situe en dessous de pH 6,5 (pH de contrôle de l'activité coagulante). Ces écarts sont liés aux teneurs relatives en chymosine et pepsine des présures.

Le même type de problématique est rencontré lorsque l'on substitue de la chymosine fermentaire à de la présure. Si les mêmes dynamiques de coagulation sont recherchées (temps de prise, vitesse d'agrégation et fermeté au décaillage), l'apport de chymosine fermentaire doit être d'autant plus augmenté que le pH d'emprésurage est bas et que la présure originelle est riche en pepsine. La protéase de *C. parasitica* qui induit une vitesse d'organisation de gel très rapide et une dégradation significative des rendements par rapport à l'emploi de la chymosine, reste encore largement utilisée en technologie pâtes pressées cuites (Collin, 2015).

Au cours d'une fermentation lactique le pH a tendance à diminuer. Chez les lactobacilles la fermentation est stoppée lorsque le pH atteint la valeur de 4. Le pH optimal de croissance des lactobacilles se situe selon les espèces entre 4,5 et 6,4. Les cultures en fermenteur de *L. casei* sont généralement régulées à un pH compris entre 5,5 et 6,5 ; Aeschlimann et Von Stockar (1989) ont étudié l'influence du pH sur les performances d'une culture en continue de *L. helveticus* et obtiennent des concentrations maximales en biomasse et en acide lactique pour un pH de 5,5. Keller et Gerhardt (1975) ont constaté pour une culture en continue de *L. bulgaricus*, qu'une augmentation de pH de 5,5 à 6 entraîne une diminution de la concentration en substrat dans le fermenteur (Morabito, 1994).

Une même augmentation de pH provoque chez *L. delbrueckii* une baisse du taux de croissance ainsi que la vitesse spécifique de production d'acide lactique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les travaux de **Altaba, (1991)**, réalisés sur *L. casei*, ont montré que le pH compris entre 5,8 et 6,2 ne provoque pas de grands changements dans les résultats de la fermentation. Alors que pour un pH de 5,6, la concentration en biomasse et en acide lactique chutent légèrement.

Le pH semble également avoir une influence sur le comportement fermentaire des bactéries lactiques. Ainsi **Rhee et Pack, (1980)** ont constaté chez *L. bulgaricus*, après une augmentation de pH, le passage d'un métabolisme homofermentaire à un métabolisme hétérofermentaire (production de formate, d'acétate et d'éthanol).

Dès 1928, **Rogers et Whittier** remarquent une meilleure croissance de *S. lactis* à pH régulé (entre 5,8 et 6) que sans régulation de pH. Ces auteurs concluent à une inhibition conjointe des ions hydrogène (chute du pH) et de la forme non dissociée de l'acide lactique. En effet, l'acide lactique a un pKa de 3,86 (dans les conditions standard), la concentration en forme non dissociée est d'autant plus forte que le pH est bas. **Simon et Beevers, (1952)**, dans une étude très vaste sur l'effet des acides faibles sur différents organismes vivants, montrent qu'en dessous du pKa, le pH n'a que très peu d'effet sur la réponse d'un organisme et, qu'au-delà, la réponse est proportionnelle à la quantité d'acide non dissocié. Plus récemment, il a été montré que le pH influençait la vitesse de croissance des bactéries et que la concentration en lactate non dissocié influençait les rendements de conversion du substrat en biomasse et en produit, ainsi que le rendement en ATP, la vitesse de croissance et la productivité (**Morabito, 1994**).

Un pH élevé dans le fromage frais détermine une consistance souple et une pâte facile à couper, tandis que le fromage devient friable et de pâte courte à un pH trop bas. Un pH élevé est obtenu en premier lieu en employant un lait relativement pauvre en bactéries lactiques. La fermentation lactique devient alors lente, la perte de chaux est peu considérable, et le fromage prend un pH relativement élevé et une consistance souple (**Haglund et al, 1928**).

Il intervient sur les vitesses d'activité enzymatique, la disponibilité en certains ions qui se complexent avec les protons et sur la perméabilité des membranes cellulaires. Lors de la production de yaourt, il évolue librement vers un pH acide, et représente donc un facteur majeur de ralentissement du métabolisme bactérien (**Béal et al, 2003**).

3.1.1.2. La température

La coagulation enzymatique du lait est fortement dépendante de la température. La vitesse de formation du coagulum augmente progressivement de 20 à 40-42°C. En dessous de 10°C, la gélification ne se produit pas. L'effet le plus important de la baisse de la température est la solubilisation du phosphate de calcium micellaire à une température plus élevée, le processus de coagulation ralentit. Il s'arrête à 55°C.

Après un chauffage, il y a une augmentation du temps de gélification par la chymosine accompagnée d'une diminution de la fermeté du gel formé. D'après leur étude, le chauffage a un léger effet au niveau de la phase primaire (enzymatique) de la coagulation, tandis que son effet reste marqué au moment de la phase secondaire (phase d'agrégation des protéines) (Ilboudo et al, 2012).

3.1.1.3. L'acidité Dornic

La mesure de l'acidité du lait est un indicateur de l'activité des bactéries lactiques. Ce test a l'avantage d'être très facile à mettre en œuvre, peu coûteux et de donner un résultat immédiat. A la sortie de la mamelle, le lait sain a une acidité naturelle comprise entre 15 et 21 °Dornic (14 à 16 °D pour le lait de chèvre et 21 à 23 °D pour le lait de brebis). Il existe des variations entre troupeaux.

Au cours du procédé de transformation, on surveille l'augmentation de l'acidité. Dans les procédés de fabrication des yaourts, des caillés, des crèmes, la mesure de l'acidité Dornic est utile pour vérifier la bonne activité des ferments lactiques et stopper les fermentations au bon moment. L'augmentation de l'acidité du lait, lorsqu'elle est involontaire, est un signe de mauvaise hygiène et d'un développement intense de microorganismes (mauvais refroidissement par exemple).

La mesure de l'acidité Dornic a cependant des limites. Ce test mesure en effet l'activité de la flore lactique, or il existe de nombreux microorganismes qui se développent sans augmenter le degré Dornic, en particulier ceux qui se multiplient à basse température, de +6 à +12°C (les psychrotrophes et les psychrophiles). Un lait conservé 48 heures à +6°C peut donc être fortement contaminé sans que le test de l'acidité Dornic ne le révèle (Dudez et al, 2017).

Etude

Expérimentale

Introduction

Dans les transformations artisanales le ferment fermier le plus couramment utilisé est le lactosérum (petit lait prélevé sur la transformation de la veille) pour ensemencher le lait du jour. Cette technique appelée repiquage est garante de la spécificité des produits de la ferme et, est donc considérée par les éleveurs transformateurs comme essentielle à maintenir.

Or, sa maîtrise, de nature multifactorielle repose sur des pratiques empiriques, est difficile. Seulement dans ces cas, l'utilisation du lactosérum, semble résoudre les problèmes de repiquage à court terme, mais pas de façon durable. Cette problématique est complexe car de nombreux facteurs sont impliqués dans la conduite du repiquage avec ce sous produit.

L'idée est de fabriquer soi-même un ferment avec les microflore spécifiques de la ferme, pour éviter d'utiliser les microflore « standardisées » des ferments du commerce. Les ferments indigènes étudiés étaient basés sur la mise en fermentation à température contrôlée du lait cru de mélange issu de la traite manuelle de vaches (présumées saines). Après fermentation, l'objectif est que ces ferments aient atteint une acidité de 75°Dornic.

Cette étude cherche en premier lieu à mesurer l'aptitude fermentaire du lait cru, son pouvoir acidifiant et ensuite le tester en comparaison avec un ferment et une présure du commerce dans des essais de fabrication de 3 types de fromages.

I. Matériels et méthodes

1.1. Choix de la région d'étude

Les zones de montagne s'étalant de la région de Guelma à Souk-Ahras ont été retenues (**Figure 3**), elles restent prédisposées pour l'élevage du bovin laitier. Une forte concentration de petits éleveurs continue d'exploiter ces zones difficiles en système sylvo-pastorale (**Tableau 7**). Ces élevages familiaux subsistent et sont périodiquement confrontés à un surplus de lait, dont la valorisation reste marginale et génère peu de revenu.

Dans ces zones le réseau de collecte reste facultatif, son activité apparait durant la période d'abondance du lait, qui coïncide avec le printemps. La commercialisation de l'excès de lait de ces élevages dépend du bon vouloir des collecteurs ambulants et prend souvent un caractère informel. Les fréquences de passage sont variables et dépendent des quantités de lait produites dans chaque élevage. La collecte se limite souvent à un passage après la traite du matin.

Dans ces conditions difficiles de production et de collecte du lait cru, d'une part une bonne partie échappe au circuit de collecte, d'autre part la qualité hygiénique et nutritionnelle des quantités de lait acheminées vers les circuits commerciaux peuvent être altérés.

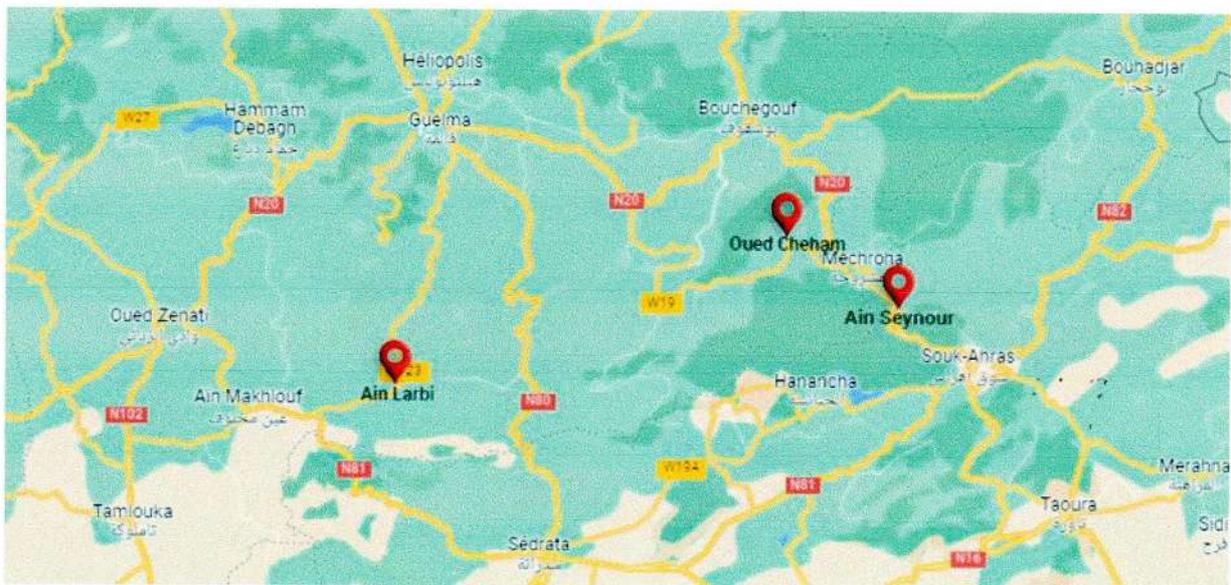


Figure 3 . Répartition géographique des zones d'élevage retenues

Tableau 7. Coordonnées GPS des zones d'élevage.

Zones	Cordonnées
Ain Seynour	36°19'19.1"N 7°52'29.8"E
Oued Cheham	36°22'29.6"N 7°45'51.0"E
Ain Larbi	36°16'13.6"N 7°23'25.1"E

1.2. Prélèvements

Nous avons retenu 3 zones d'élevage, à savoir (Oued Cheham, Ain seynour, Ain Larbi), l'opération de prélèvement a été effectuée dans le tank du lait cru de mélange après

la traite du matin dans des récipients stérilisés. L'échantillonnage est un point clef pour obtenir des résultats analytiques valides. Les éleveurs retenus pratiquent une traite manuelle traditionnelle, ce choix préserve les conditions de l'environnement et leurs impacts sur de production du lait cru et ses qualités.

Avant et pendant les manipulations au laboratoire, les règles d'hygiène sont respectées pour éviter d'altérer les l'échantillon lors des analyses physicochimiques et technologiques.

1.3. Analyses et mesures

1.3.1. Analyses physicochimiques

L'appareil utilisé (Lactoscan SP) est un analyseur de chimie moderne adapté à l'analyse de chaque type de lait. Les résultats de l'analyse sont affichés dans les 60 secondes sur l'écran, le **Tableau 8** indique les paramètres avec une précision acceptable :

Tableau 8. Précision des paramètres mesurées avec (Lactoscan SP)

Paramètres	Plage de mesure	Précision
Graisse	0.01% à 25%	± 0.1%
SNG	3% à 15%	± 0.15%
Densité*	1015 à 1040 Kg/m ³	± 0.3 Kg/m ³
Protéines	2% à 7%	± 0.15%
Lactose	0.01% à 6%	± 0.20%
Addition d'eau	0% à 70%	± 3%
Température	1°C à 40°C	± 1°C
Point de congélation	- 0.4 à - 0.7°C	± 0.001°C
Sels	0.4% à 1.5%	± 0.05%
pH	0 à 14	± 0.05%
Conductivité	3 à 14 [mS/cm]	± 0.05%
Solides total	0 à 50%	± 0.17%

* La densité mesuré en pourcentage. Les données de la densité sont présentées sous forme abrégée. Par exemple 27.3 doit être compris comme 1027.3 Kg/m³. Pour déterminer la densité du lait, noter le résultat de l'affichage et ajouter 1000.

1.4. Aptitude fromagère du lait cru

Cette méthode permet de déterminer l'aptitude du lait nonensemencé avec du lactosérum à s'acidifier naturellement. Cette mesure permet d'apprécier sa richesse originelle en flore lactique (flore acidifiante).

Le pH est mesuré à l'aide du pH-mètre. Pour le dosage de l'acidité Dornic, on introduit 10 ml de l'échantillon dans un bécher de 100 ml, on rajoute 4 gouttes de solution de phénolphaléine. Le titrage est effectué par la solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 N jusqu'au début du virage au rose. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

1.4.1. Aptitude fermentaire naturelle du lait cru

Pour chaque lait, on prélève 50 ml dans un flacon stérile préalablement identifié. On mesure le pH et l'acidité Dornic et on note l'heure. Les flacons sont entreposés à température ambiante 22°C, le lendemain matin à la même heure on refait les mêmes mesures.

1.4.2. Pouvoir acidifiant du lactosérum

Pour déterminer l'aptitude d'un lactosérum à acidifier un lait par comparaison de l'évolution de l'acidité d'un lait seul et du même laitensemencé avec le lactosérum à tester. Pour chaque prélèvement on procède comme suit :

Prendre 2 flacons stériles :

- Flacon n°1 : on met 50 ml lait seul.
- Flacon n°2 : on met 50 ml du lait, puisensemencer avec 2.5% (1.25 ml avec une seringue) de lactosérum et mettre au bain marie à 30°C et les fixer pendant 4 heures.

On mesure l'acidité Dornic et la température du lait de départ et du laitensemencé avec le lactosérum. 4 heures après la mise au bain marie, on mesure l'acidité Dornic et la température des flacons n°1 et n°2. On calcule la variation $\Delta 1$ et $\Delta 2$ pour le flacon n°1 et n°2 entre H0 et H4.

$$\Delta 1 = A1 - A0$$

$$\Delta 2 = A2 - A0$$

Calcule le pouvoir acidifiant (P.A) du lactosérum :

$$PA = \Delta 2 - \Delta 1$$

1.5. Sélection et testage du ferment

1.5.1. Thermisation du lait

Les laits utilisés ont été prélevés dans les tanks de mélange, ou les niveaux de flores s'accroît biofilms avec le nombre de transvasements subits avant d'être soumis aux analyses de laboratoire. Ceci confère à chaque lait un profil fermentaire, qui sera fonction des charges en flore lactique au départ, perçu à travers les variations du pH et l'acidité titrable.

Pour cette opération on retiendra le lait de la zone qui présente la meilleure aptitude fromagère. La thermisation s'est effectuée avec un chauffage à deux températures :55 et 65°C. Le but est d'aseptiser une partie du lait et donc par la même occasion de détruire certains germes.

- Chauffer le lait à 55°C, ensuite prendre 2 flacons stériles et mettre 400 ml de lait seul, puis les incuber au bain marie à une température de 37°C et 45°C pendant 4 heures.
- on répète la même opération mais avec un chauffage à 65°C

On mesure l'acidité Dornic et le pH du lait thermisé des 4 flacons chaque heure pendant la durée d'incubation dans le bain marie (4 heures).

A la fin de la procédure les 4 flacons stériles :

- Flacon : On met 200 ml de lait cru avec 50 ml du lait thermisé pour chaque échantillon.
- Et on les laisse pendant 24 heures dans une température d'environ 12°C.

1.5.2. Test de floculation

La technique du point de floculation ou temps de prise est une technique simple pour estimer si la présure utilisée est de bonne qualité et estimer le temps nécessaire pour lequel le caillé devrait être coupé. Cela permet aussi d'avoir un aperçu sur la qualité du lait.

Si le temps de floculation varie significativement on ajuste la quantité de présure en conséquence, afin de nous rapprocher des valeurs attendues.

Procédure:

- Prendre 7 flacons stériles
- Chauffer le lait à 33°C.
- Mettre 100 ml de lait chauffé à 33°C dans les flacons transparents et procéder à l'ensemencement avec de la présure et chronométrer jusqu'au point de floculation.

1.6. Essais de fabrication du fromage

Pour tester les levains fermiers sélectionnés (LM : levain mère et LFT : Levain fille thermisé) issus des fermentations du lait cru, nous avons procédé à la fabrication de trois types de fromages classiques à savoir : fromage frais (FF) ; du fromage à pâte molle (FM) et du fromage à pâte pressée (FP). Parallèlement nous avons fait des essais avec de la présure et un ferment du commerce.

Préparer 5 barquettes plastiques de 400 ml, chauffer le lait cru à 32°C, ensemercer et placer à une température stable de 27°C pendant 24 heures. Le lendemain matin on procède au moulage et à l'égouttage pour le fromage à pâte fraîche (FF) et molle (FM), et au saumurage et pressage pour le fromage à pâte pressée (PP).

1.7. Estimation des rendements fromagers

Les rendements seront calculés à partir des taux de matières utiles (TP et TB) des analyses chimiques et des essais de fabrication.

Résultats
et
discussions

II. Résultats

2.1. Paramètres physicochimiques

Les résultats moyens des paramètres physicochimiques sont reportés au (Tableau 9). Les moyennes des matières utiles en vue de la transformation fromagère révèlent que le lait cru de la zone d'Ain-Seymour présente des qualités en TP et TB qui répondent aux critères de technologie (Figure 4).

En effet les TP et TB de Ain Seymour sont les meilleurs (40 g/L est >37 et 57 g/L > 40 g/L) sont conformes aux normes requises.

Tableau 9. Résultats des paramètres physicochimiques

	T (C°)	Lipides	Densité	Protéines	Lactose	Sels	A _w	PC	pH	AD°
Ain Larbi	24,8	2,6	1,029	3,2	4,5	0,67	0,75	0,517	7,1	32
Oued Cheham	25,9	2,6	1,026	4,3	4,9	0,77	0,0	0,571	6,87	24
Ain Seymour	25,4	5,7	1,027	4	4	1	0,0	0,484	7,06	22

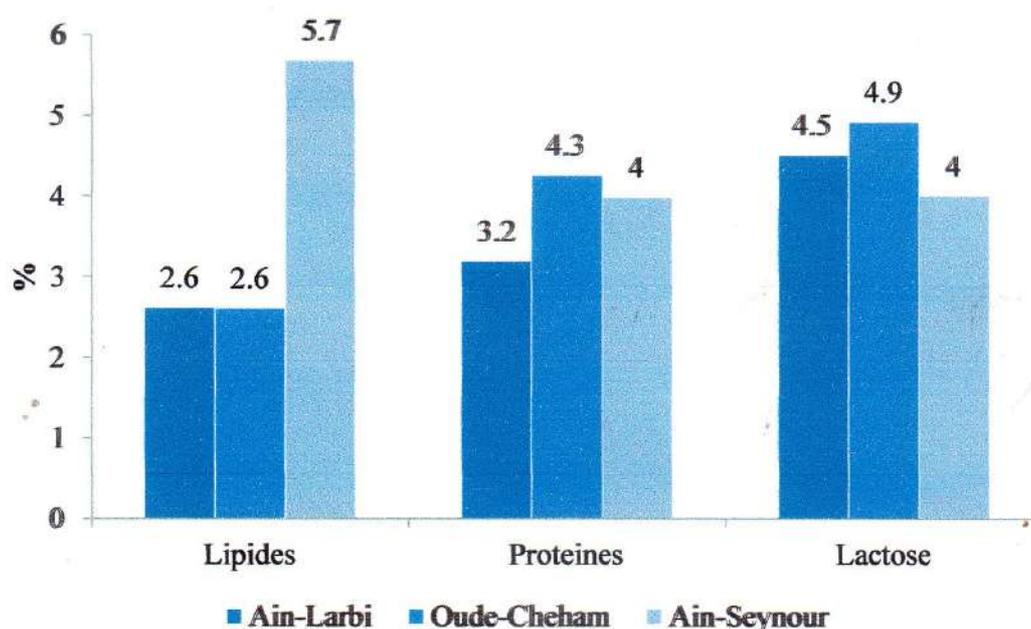


Figure 4. Taux des matières utiles

2.1.1. Calcul du rendement fromager

En fabrication fromagère les calculs périodiques de rendement sont nécessaires. Le rendement fromager réel (RR) est une opération facile à réaliser car il suffit de connaître la quantité de lait et le poids du fromage produit à un stade choisi du processus de fabrication.

Le rendement réel (RR) a été calculé sur le procédé de fabrication du fromage frais (FF) et estimé après pesée au démoulage à **23 kg / 100 litres de lait**. Le rendement théorique (RT) non ajusté est estimé à partir de la relation suivante :

$$\text{- RT (non ajusté)} = 0.093\text{TB} + 0.380\text{TP}$$

$$\text{TB} = 57 ; \text{TP} = 40$$

- RT non ajusté :

$$\text{RT} = (0.093 \times 57) + (0.380 \times 40) = 5.3 + 15.2 = 20.5 \text{ kg/100L}$$

Pour corriger le rendement théorique on calcule le coefficient d'ajustement K :

- Coefficient d'ajustement $K = \text{RR} / \text{RT (non ajusté)}$

$$K = 23 / 20.5 = 1.12$$

- On Calcule le rendement théorique corrigé

$$\text{RT} = K \times (0.093\text{TB} + 0.380\text{TP})$$

$$= 1.12 (0.093 \times 57 + 0.38 \times 40) = 22.96 \text{ kg/100L}$$

Après calcul le rendement théorique est inférieur au rendement réel 22.96 kg/100L < 23 kg / 100 litres ceci indique la correction est acceptable. Si la différence calculée est $\leq 2\text{Kg}/100\text{L}$, il va falloir prendre les mesures d'une autre fabrication pour corriger le coefficient K.

2.2. Aptitude fermentaire du lait cru

Pour cette opération le prélèvement a été effectué après la traite du matin dans des récipients stérilisés dans le tank du lait cru de mélange. Entreposé à température ambiante cela a permis aux bactéries, dont la température optimale de multiplication se situe entre 20 et 30°C avec une possible multiplication entre 10 et 35°C. Nos résultats, pour les trois zones (**Figure 5**) sont nettement au-dessous du niveau d'acidification requis pour les fromages > 45 °D.

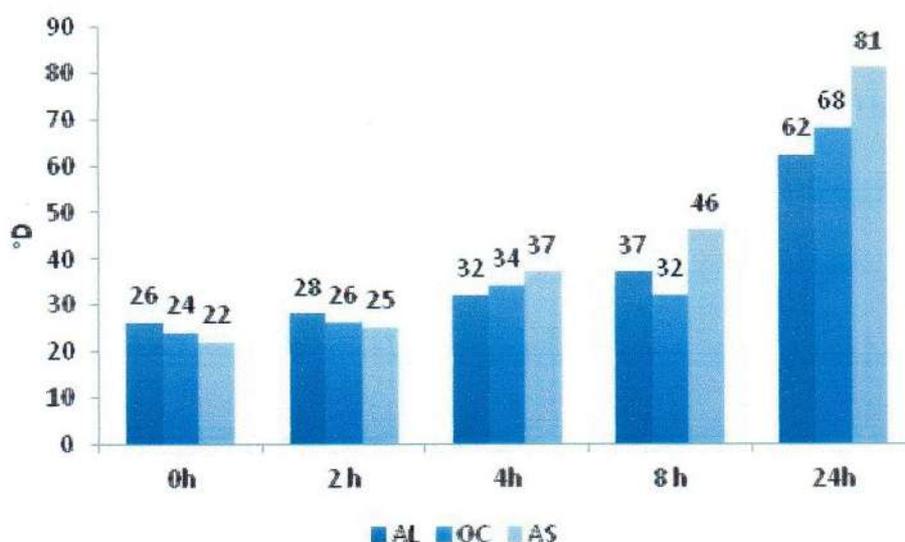


Figure 5. Aptitude fermentaire du lait cru à 24h

2.3. Pouvoir acidifiant du lactosérum

Pour les laits des trois zones, le test du pouvoir acidifiant montre un gain notable (Figure 6) aussi bien pour le lait cru sel (LC) que pour le lait cru,ensemencé au lactosérum (LC+LS). Le lait de la zone d’Ain-Seymour donne les meilleurs résultats (Tableau 10) pour le LC et le LC+LS, un gain de 08 et 13°D, respectivement) ce qui confère un pouvoir acidifiant global de 30°D.

Tableau 10. Résultats du pouvoir acidifiant global (PAG)

Ain Larbi	Oued Cheham	Ain Seymour
LC = 27 – 21 = 06	LC = 32 – 27 = 05	LC = 32 – 24 = 08
LC+LS = 32 – 21 = 11	LC+LS = 35 – 27 = 08	LC+LS = 37 – 24 = 13
PA = 11 – 6 = 05	PA = 8 – 5 = 03	PA = 13 – 8 = 05
PAG = 30	PAG = 18	PAG = 30

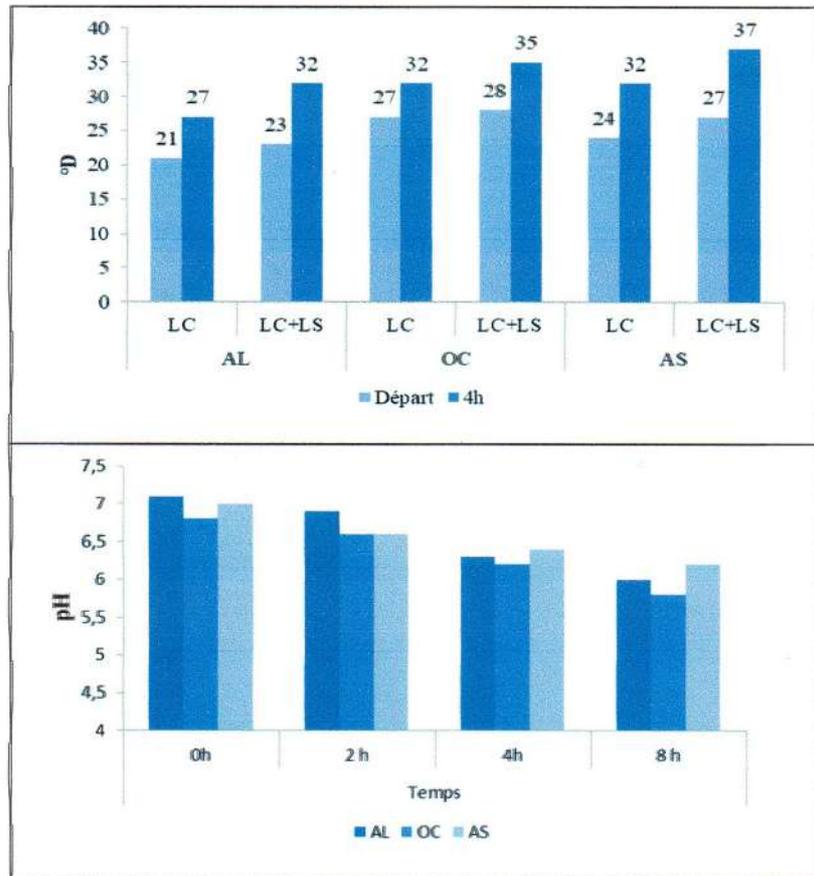


Figure 6. Pouvoir acidifiant du lactosérum (°D et pH)

2.4. Thermisation et incubation

2.4.1. Traitement du levain

La mise au point d'un test pour évaluer l'aptitude fermentaire des levains est nécessaire. Ce test est utile pour savoir si un problème d'acidification est dû au lait et/ou au ferment indigène, voire à une mauvaise adéquation entre les deux, en évaluant séparément leurs aptitudes acidifiantes et leur interaction.

Le pH et l'acidité Dornic ont été mesurés jusqu'à 24 h pour les deux types de traitement et incubation. Ces manipulations nous ont permis de connaître la capacité acidifiante du levain mère (LM) et du levain fille thermisé (LFT).

Nos résultats (Figure 7) sont en dessus de 65°D et au dessus d'un pH de 4,6 à 24 heures d'incubation, le lait de Ain-Seymour à une capacité acidifiante acceptable.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

En dessous de 30-35°D ou au-dessus de 5,8 de pH, le lait sera jugé peu acidifiant. En fonction de la capacité acidifiante du lait et de sa charge microbienne, on adaptera la préparation du lait.

Nos résultats révèlent deux profils : un profil lent et un profil rapide (Figure 7). Le profil lent donne en général des pâtes fromagères plus fines, alors que le profil rapide permet une meilleure protection par rapport aux pathogènes. Dans les pratiques fromagères, il est souhaitable de se situer entre ces deux types de profil mais pas au-delà de ces bornes (Sylvie et al, 2004).

Dans le cas où le lait a une faible capacité acidifiante, on le préparera davantage en augmentant la dose de lactosérum, le temps de maturation, et la température dans une certaine mesure.

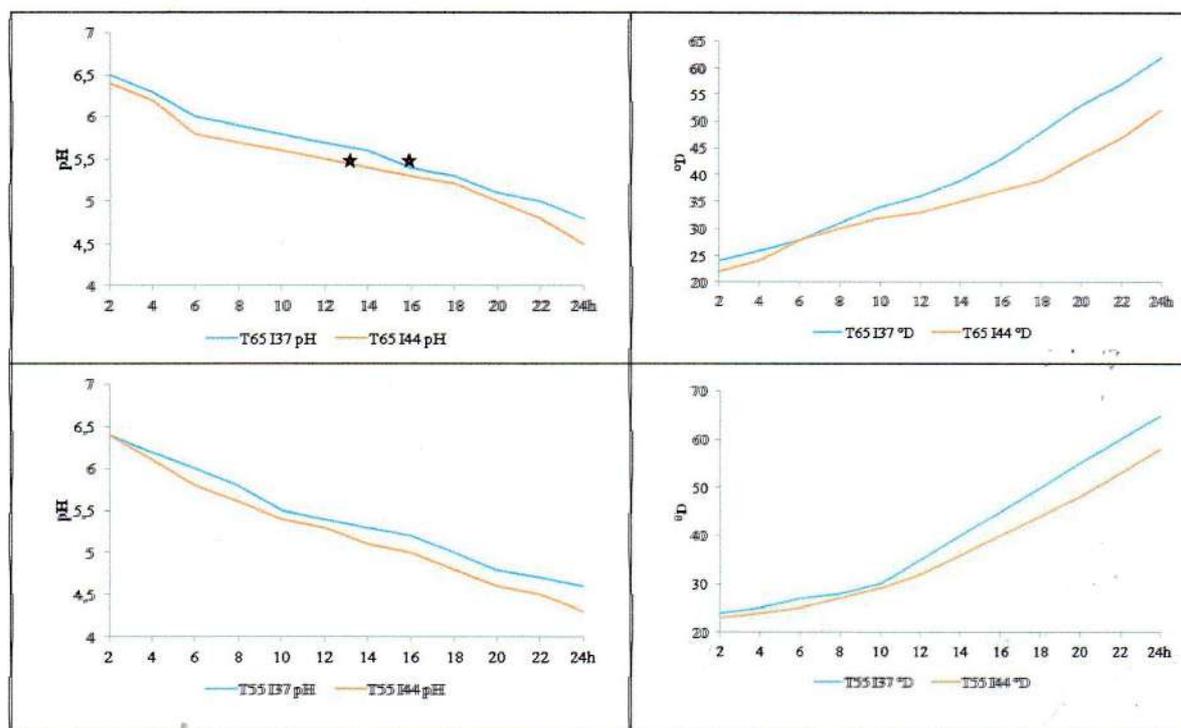


Figure 7. Pouvoir acidifiant du lait thermisé, levain mère (LM) et levain fille thermisé (LFT) en fonction de la température de traitement (T55 - T65°C) et d'incubation (I37 et I44°C).

En effet le lait contient peu de microorganisme lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml) (Guiraud, 1998). Cette flore se définit comme l'ensemble des microorganismes qui se retrouvent dans le lait à la sortie du pis, il devrait contenir moins de 5 000 UFC/ml, les principales flores sont *Micrococcus* 30-90%, *Lactobacillus* 10-30%, *Streptococcus* et *Lactococcus* < 10% (Vignola, 2002).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Au cours d'une fermentation lactique le pH a tendance à diminuer. Chez les lactobacilles la fermentation est stoppée lorsque le pH atteint la valeur de 4. Le pH optimal de croissance des lactobacilles se situe selon les espèces entre 4,5 et 6,4. Les cultures en fermenteur de *L. casei* sont généralement réglées à un pH compris entre 5,5 et 6,5 ; Aeschlimann et Von Stockar (1989) ont étudié l'influence du pH sur les performances d'une culture en continue de *L. helveticus* et obtiennent des concentrations maximales en biomasse et en acide lactique pour un pH de 5,5. Keller et Gerhardt (1975) ont constaté pour une culture en continue de *L. bulgaricus*, qu'une augmentation de pH de 5,5 à 6 entraîne une diminution de la concentration en substrat dans le fermenteur (Morabito, 1994).

2.5. Essais de fabrication, floculation et coagulation

2.5.1. Doses et ferments testés pour la floculation



Photo 1. Ferments testés

Les résultats obtenus montrent (Photo 2) la formation de petits grumeaux qui collent sur le bord du flacon après des durées variables (Tableau 11, Photo 1). Les meilleurs résultats ont été enregistrés avec les doses de 0,75 - 1 et 2 ml.

Ces résultats s'expliquent par le fait que le lait contient des matières protéiques qui se classent en deux catégories d'après leur solubilité dans l'eau et leur stabilité : d'une part, les caséines qui sont en suspension colloïdale, se regroupent sous forme de micelles et

RESULTATS ET DISCUSSIONS

précipitent sous l'action de la présure ou lors de l'acidification à un pH d'environ 4,6, d'autre part, les protéines du sérum qui sont en solution colloïdale et qui précipitent sous l'action de la chaleur (Vignola, 2002).

Tableau 11. Dosage des ferments résultats des tests de la vitesse de floculation, coagulation

Produit	Dosage	Floculation	Coagulation
Levain mère	7 ml	16h	36 h
Levain fille thermisé	7 ml	52mn	280mn
Ferment de commerce	0.5 ml	40mn	240mn
Présure	0.12 ml	2mn	132mn
Présure	0.25 ml	4mn	74mn
Présure	0.5 ml	30 s	66mn
Présure	1 ml	12 s	54mn
Présure	2 ml	10s	42mn

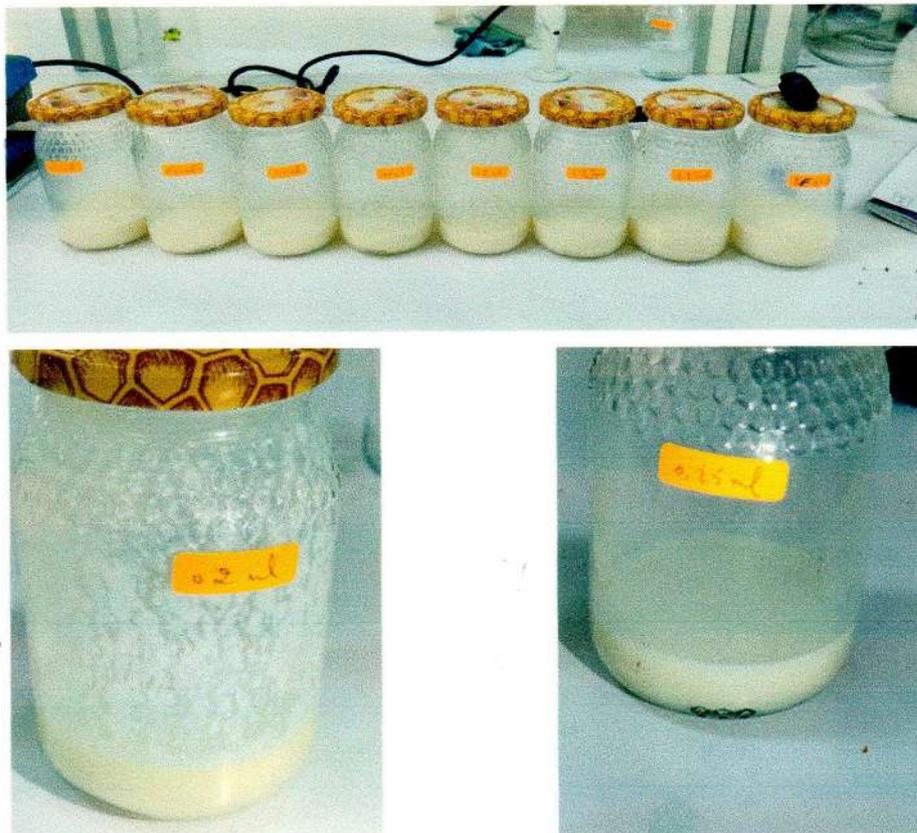


Photo 2. Test de Floculation

2.5.2. Fabrication

Après testage à l'emprésurage et mesures des vitesses de floculation et coagulation et vue nos résultats, nous avons ajusté les doses pour les essais de fabrication dont les vitesses de floculation ont été un peu longues. Pour nos essais de fabrication nous avons procédé à la réalisation de trois types de fromages Fromage (FF, **Photos 3 et 4**), fromage à pâte molle (FM, **Photo 5**) et fromage à pâte pressée (FP, **Photo 6**) (**Tableau 12**).

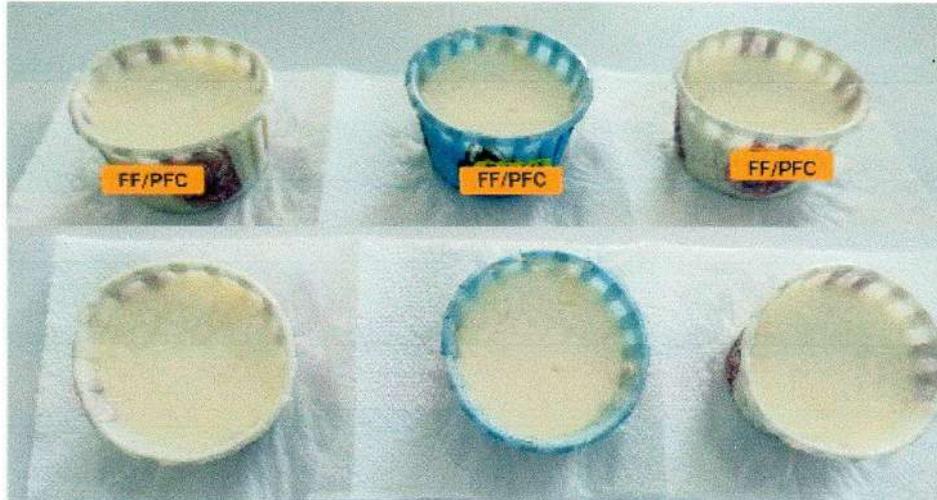


Photo 3. Fromage frais (PFC)

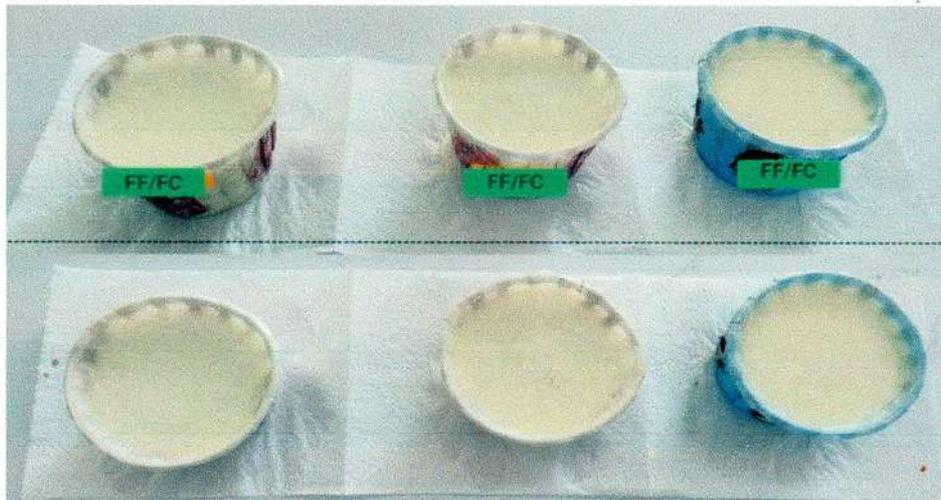


Photo 4. Fromage (FC)



