

N°345

DÉCEMBRE 2016

REVUE DES

enil



LES FERMENTS LACTIQUES



Comme annoncé précédemment, notre Revue des ENIL évolue et vous êtes en possession de notre 1^{er} numéro dans le format « dossier thématique ».

Ce nouveau format sera édité tous les 6 mois (en début et milieu d'année) et traitera alternativement de sujets techniques et technologiques dans le domaine de la transformation laitière. C'est tout naturellement que ce 1^{er} dossier thématique traite des ferments lactiques puisque, nous le savons tous, sans eux point de produits laitiers et à fortiori de fromages.

Notre revue a pour vocation de mettre en lumière les savoirs faire et expertises du Réseau des ENIL et ACTALIA. Les rédacteurs de celle-ci sont donc tous membres de ce réseau : enseignants, chercheurs, élèves et anciens élèves.

Les dossiers thématiques s'adressent bien entendu en premier lieu aux techniciens de la transformation laitière, mais aussi aux salariés du réseau et anciens élèves des ENIL.

Leur diffusion au format papier, gratuite vers les entreprises de la transformation laitière est complétée par une diffusion et mise à disposition au format électronique. Si vous n'êtes pas destinataire et malgré tout intéressé par notre revue, faites-nous le savoir (www.anfopeil-enil.fr).

Nous restons bien entendu à l'écoute de toutes vos remarques ou suggestions (accueil@anfopeil-enil.fr) pour faire évoluer cette revue et la rendre la plus attractive possible.

Didier JOUBERT
Président ANFOPEIL

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :

Didier JOUBERT
Président ANFOPEIL

N° ISSN: 0395-6865

IMPRIMERIE Seigle-Ferrand
39800 POLIGNY
Dépot légal décembre 2016

ANFOPEIL

BP10025
39800 POLIGNY

accueil@anfopeil-enil.fr
03 84 37 27 24

SOMMAIRE



- **INTRODUCTION**.....1
- Franck NEYERS : Enseignant en génie alimentaire - ENILA
- **GÉNÉRALITÉS**.....2
- F. NEYERS
- **IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES FERMENTS LACTIQUES**.....5
- Valérie MICHEL : Responsable du pôle microbiologie laitière - ACTALIA
- **CRITÈRES DE CHOIX DES BACTÉRIES LACTIQUES**.....7
- Jean-René KERJEAN : Responsable scientifique - ACTALIA Produits laitiers
- **DES FERMENTS AU SERVICE DE LA TECHNOLOGIE**.....16
- Cécile CHARLES : Chargée de mission expérimentation ENILV
- **LES NSLAB**.....19
- Nadège BEL, Olivier SGARD : ACTALIA Produits laitiers
- Bruno MATHIEU : Syndicat professionnel du Reblochon
- **GESTION DU RISQUE PHAGIQUE EN ATELIER FROMAGER**.....22
- Pierre SECHET : Enseignant en génie alimentaire - ENILIA
- Sarah CHUZEVILLE : Chef de projets microbiologie ENILIA
- **STAGES ANFOPEIL**.....28
- Thierry MICHELET : Coordinateur - Responsable pédagogique - ANFOPEIL

INTRODUCTION F. NEYERS, Enseignant en génie alimentaire - ENILA

Nous avons toujours vécu avec elles, elles sont en nous, dans notre environnement proche, dans les aliments que nous consommons. Les bactéries lactiques sont un ensemble de bactéries qui selon le contexte peuvent être symbiotiques (flore lactique de notre microbiote intestinale) commensales (dans les aliments fermentés), mais surtout indispensables. Nous les retrouvons partout, nous les utilisons au quotidien, mais notre recherche aux rendements, à l'efficacité, la productivité, réduit constamment le nombre de souches que nous utilisons en industrie fromagère. Dans le domaine des ferments lactiques, comme dans tous les secteurs d'utilisation du vivant, nous assistons à une perte de biodiversité.

Les principaux fournisseurs de ferments lactiques répondent à la demande de leurs clients, en proposant le ferment « idéal », mais ils cherchent également de nouvelles souches ayant un intérêt technologique, une innocuité sanitaire, mais aussi une bonne aptitude à la culture et l'utilisation en process laitiers.

Ce premier dossier technique de la Revue des ENIL, tente de faire le point sur ces ferments, afin de mieux les connaître, mieux les utiliser, optimiser leur capacité, rationaliser leurs utilisations. Nous ferons le tour des connaissances actuelles en quelques pages, ferons le point des applications dans le secteur plus particulier de l'utilisation des ferments lactiques en fromagerie.

Après une présentation de ces germes, une classification, nous verrons quels sont les critères de choix de ces bactéries en fromagerie.



Une information sur les techniques actuelles de production permettra de mieux comprendre comment ces ferments « industriels » impactent directement sur leurs utilisations (durée de la phase de latence et complément d'acidificateur pour des correcteurs de pH). Les ferments du commerce n'étant pas les seules souches utilisées par les fromagers, les ferments sauvages, les pieds de cuves, les NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) sont autant d'autres sources de potentiels acidifiants mis en exergue par les filières traditionnelles, fermières et AOP.

Ce dossier sera également complété par un article sur les phages lactiques et les moyens de luttés en technologies fromagères. En complément de ces articles, une présentation des stages ANFOPEIL sur les ferments lactiques sera faite.

DOMAINE D'APPLICATION EN LAITERIE

Les bactéries lactiques sont des bactéries acidifiantes, aromatiques, historiquement utilisées comme agents de conservation des produits laitiers : acidification en laits fermentés (pH de 4.2 à 4.9), en beurrerie (pH inférieurs ou voisins de 5), en crème de consommation (pH < 5.8) et pour de nombreux fromages (pH démoulage compris entre 4.2 et 5.2).

Elles sont quasi indispensables, par le biais de ces acidifications texturation (yaourts, fromages blancs et crèmes épaisses) et contribuent fortement au non développement des flores pathogènes (en dessous d'un pH de 5.2). Ces bactéries sont également utiles pour l'aromatisation des produits laitiers, elles produisent, en plus de l'acide lactique, divers composés d'arômes, caractéristiques de la saveur de nos aliments : acétaldéhyde² dans le yaourt, diacétyle³ dans le beurre, la crème, les fromages gras, accompagné de CO₂, utiles pour l'ouverture de certaines pâtes fromagères (pâtes persillées entre autres).

IMPORTANCE TECHNOLOGIQUE

Par l'acidification progressive du lait et du caillé, les bactéries lactiques contribuent à l'égouttage des fromages. La vitesse et la durée d'acidification génèrent une déminéralisation plus ou moins rapide du caillé (ou une minéralisation plus ou moins rapide du sérum). Les valeurs finales de pH fixent le caractère du fromage (lactique / enzymatique⁴), sa perméabilité au sel (influence sur le type de salage), à l'air (freintes en ressuage et affinage), et sélectionnent les flores d'affinage (plus ou moins acido-sensibles).

Une acidification non conforme en lait fermenté et beurrerie et ce sont la texture, le goût, le vieillissement qui sont impactés dans le mauvais sens. Un retard ou un excès d'acidification en fromagerie, et le fromage sera différent : au démoulage, HFD⁵ et perméabilité⁶ seront impactés. L'affinage, en termes de durée et de résultats ne sera plus le même. Les bactéries lactiques utilisées correctement sont donc indispensables pour maîtriser la conservation, la caractérisation sensorielle du produit, mais aussi pour avoir un respect des cadences de production, des temps technologiques. Le suivi de l'activité des bactéries lactiques peut être mesuré via plusieurs analyses :

- **l'acidité Dornic** : l'acidité augmente de 10°D lorsqu'un gramme d'acide lactique est produit ; c'est le moyen le plus fiable de savoir si les ferments travaillent correctement ou pas (malgré l'imprécision de l'analyse) ;
- **le pH** : résultat de la production d'acide lactique (et autres) dans un milieu plus ou moins tamponné (un retard d'acidification via le suivi du pH n'est pas forcément dû à une non activité des ferments, mais à un milieu souvent plus tamponné en fromagerie industrielle) ;
- **le potentiel redox** : des pistes actuelles tendent à prouver que le suivi du Redox du milieu est une mesure intéressante pour mieux interpréter l'activité des ferments lactiques dans le lait ou le caillé.

S'il est aujourd'hui techniquement possible de fabriquer un « fromage » sans ferment, le décret fromage de 2007, modifié en 2013, rend ces ferments lactiques indispensables pour la majorité des fromages réalisés (sauf fromage caillé non acidifiés, type caillebotte, jonchée...).

IMPORTANCE ÉCONOMIQUE

Dans le coût de revient d'un fromage, les ferments lactiques ne représentent qu'une faible partie du coût matière. Malgré tout, un décalage de croissance et développement de ces germes se traduit par un produit légèrement différent (minéralisation, perméabilité, prise de sel, levuration, affinage, séchage, conservation). Un vrai retard d'acidification (0.1 à 0.2 UpH), cela conduit à des non-conformité produit grave, avec pertes matières et difficulté de retour à la normale (en cas d'attaque phagique par exemple, c'est la destruction des produits qui est le résultat le plus fréquent).



UTILISATIONS EN FROMAGERIE

Les bactéries lactiques sont utilisées en fromagerie pour acidifier : protection acide, standardisation du pH aux étapes clés du process (emprésurage, décaillage, moulage, retournements, démoulage, début affinage).

Le résultat de cette acidification contribue au tamponnement ou détamponnement du caillé :

- caillé enzymatique tamponné, acidification tardive en process, pH démoulage > 5.1 ;
- caillé lactique détamponné, acidifié rapidement, pH démoulage < 4.9.

Les bactéries lactiques permettent également d'aromatiser : les bactéries hétérofermentaires produisent divers composés caractéristiques de certains fromages ou produit frais : acétaldéhyde en yaourt, diacétyl en produits gras (fromages, crème beurre), acétoïne également. L'acide lactique produit est lui même précurseur d'arômes, lorsqu'il est re-métabolisé en acide propionique, butyrique, alcools et autres par les ferments d'affinage.

Enfin, les bactéries lactiques aromatiques sont également productrices de CO₂, qui contribuent à l'ouverture des fromages.

On utilise spécifiquement des *Leucostoc* en pâte persillée pour obtenir un caillé ouvert au démoulage, qui permettra ultérieurement l'installation puis le développement de la moisissure spécifique à ces fromages (*Penicillium roqueforti*).

Par l'acidification, les bactéries lactiques limitent l'installation et le développement des flores indésirables, voire pathogènes. Certaines souches sont aujourd'hui spécifiquement utilisées pour lutter contre des contaminants particuliers, comme les *Listéria*, les butyriques ou d'autres contaminants de surface.

CRITÈRES DE CHOIX DES FERMENTS LACTIQUES EN FROMAGERIE

Compte-tenu de toutes ces caractéristiques, il n'est pas simple de choisir les ferments lactiques à utiliser. Il s'agit toujours d'un compromis, qui permet d'obtenir les bons résultats, en terme d'acidification (vitesse et valeurs finales), d'aromatisation (composés, intensité pour un pH donné), pour un coût et des conditions de stockage et d'utilisation donnés.

GÉNÉRALITÉS

F. NEYERS, Enseignant en génie alimentaire - ENILA

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, anaérobies partiellement tolérantes à l'oxygène (microaérophiles), ne produisant pas en général de spores, se présentant sous formes de coques ou de bâtonnets et capables de fermenter les sucres en acide lactique. Elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels (notamment le lait cru) et accompagnent l'activité humaine en tant que bactéries de la flore commensale des muqueuses et de la flore alimentaire.

GÉNÉRALITÉS MÉTABOLIQUES

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies ou micro-aérophiles.

Ce sont aussi des bactéries exigeantes d'un point de vue nutritionnel car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre d'acides aminés. L'incapacité à synthétiser ces acides aminés nécessaires à leur croissance, oblige les bactéries lactiques à trouver ces molécules dans leur milieu via un processus de nutrition azotée.

Les cultures ou association de souches de différentes bactéries lactiques ayant des exigences différentes, permet de favoriser les symbioses, comme dans le yaourt. Leur culture demande des milieux riches en sucres, acides aminés, acides gras, sels et vitamines et pauvres en oxygène. Elles sont généralement cultivées dans la gélose MRS (de Man, Rogosa, Sharpe). Elles sont aptes à survivre dans des milieux très acides (pH de 4 à 5).

FERMENTS HOMO / HÉTÉRO FERMENTAIRES

Les ferments homofermentaires utilisent la glycolyse dans sa totalité, du lactose au pyruvate puis lactate. Pour être qualifiée d'homolactique, cette voie doit convertir au moins 90 % du lactose consommé en lactate. Mais dans des conditions de croissance non optimales (milieu appauvri, sur certains sucres, avec des souches mutées...), les bactéries lactiques homofermentaires peuvent présenter un métabolisme mixte, caractérisé par la production d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et d'acide formique et/ou de CO₂. La voie homofermentaire est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*.

Les ferments hétérofermentaires produisent outre l'acide lactique, des quantités significatives de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. Certaines bactéries *Leuconostoc* et *Lactobacillus* empruntent cette voie hétérofermentaire.

Un troisième métabolisme, dit de la voie fermentaire bifide est la voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*. Ces trois voies sont résumées dans le diagramme ci-dessous.

FERMENTS AROMATIQUES / ACIDIFIANTS

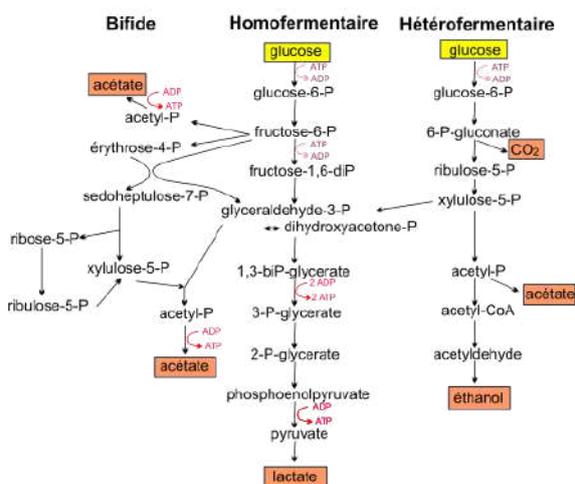
Les ferments lactiques sont tous acidifiants, ils produisent de l'acide lactique. Suivant les voies métaboliques empruntées (caractéristiques de chaque espèce), les quantités d'acides lactiques ne sont pas les mêmes : les bactéries homofermentaires sont très acidifiantes, les bactéries lactiques hétérofermentaires le sont moins et sont parfois qualifiées d'aromatiques du fait de leur production importante d'arômes divers (diacétyl, acétoïne, éthanol, acétaldéhyde...). Si des souches sont individuellement homofermentaires ou hétérofermentaires, les ferments vendus par les fournisseurs peuvent être composés de souches homofermentaires et hétérofermentaires, en proportions déterminées, ce qui confère à la culture une caractéristique plutôt acidifiante (riche en souches homofermentaires) ou aromatique (hétérofermentaires).

MÉSOPHILES / THERMOPHILES

Les bactéries lactiques sont parfois classifiées en fonction de leur température optimale de croissance : 20 à 30 °C pour les mésophiles, 40 à 45° C pour les thermophiles. Ces deux grandes familles de bactéries n'ont pas également les mêmes métabolismes azotés : on considère que les mésophiles ne sont protéolytiques qu'après leur lyse, alors que les thermophiles sont protéolytiques durant leur phase de croissance. On utilise plutôt les mésophiles pour contribuer à la désamérisation des pâtes fromagères en début d'affinage, alors que les thermophiles sont utilisés pour assouplir les pâtes pressées ou générer des enzymes texturantes en pâtes filées.

Principales caractéristiques des ferments lactiques utilisés en fromagerie (documentation fournisseur) :

	<i>Streptococcus thermo-philus</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactoba-cillus bulgaricus</i>	<i>Lactoba-cillus helveticus</i>	<i>Lactoba-cillus lactis</i>
	STH	Lc c	Lc l	Lc d	leuco	LB h	Lb b	Lb l
Lactates	L	L	L	L	D	DL	D	D
% d'acide lactique produit	0.6	0.8	0.8	0.8	<0.5	2	1.8	1.8
Citrates	-	-	-	+	+	-	-	-
	thermo	mésophiles				thermo		
Glucose	+							
Galactose	-	+	+	+	+	+	-	+/-
Protéolyse	+	Après lyse				+	+	+



MODES D'UTILISATION, DIRECT / SEMI DIRECT / REPIQUAGE

L'utilisation en repiquage consiste à partir d'une souche mère, du commerce ou autre, de la multiplier dans des conditions d'hygiène optimale pour obtenir un ferment apte à être transféré dans la cuve de fabrication. La population d'un ferment repiqué est en général proche de 10⁸ germes / g.

L'utilisation en semi-direct, ou production d'un grand levain, consiste à faire se développer une souche du commerce dans un milieu préparé pour obtenir un levain actif à mettre en cuve.

L'utilisation en direct consiste à l'ajout d'une culture concentrée directement en cuve de fabrication. Le taux d'ensemencement, quelque-soient les méthodes, conduit à un taux de 10⁶ germes / gramme de lait ou équivalent. Les ferments congelés contiennent environ 10¹⁰ germes / gramme, les ferments lyophilisés contiennent plutôt 10¹² germes/gramme.

Source : CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25978752>

UTILISATION DES FERMENTS ET RÉGLAGE DES pH

Durabilité globale

	Présentation et utilisations des ferments	Avantages	Inconvénients
Durabilité globale	Liquide, repiquage	Peu couteux Indépendance technique plus importante	Investissement initial : Risque de contamination par les manipulations Irrégularité des résultats Demande de technicité
	Semi direct (congelés)	Intermédiaire	
	Direct (lyophilisés)	Peu de manipulation, donc peu de risques de contamination Cultures pures, très spécifiques, donc activité régulière Pas d'investissement matériel	Cultures pures, très spécifiques, donc sensibilité phagique accrue Coût d'utilisation élevé Forte dépendance aux fournisseurs Utilisation de régulateur de pH pour rattraper les latences importantes

Ce pied de cuve est parfois complété par des ferments du commerce pour palier à d'éventuelles usures, ou contamination du caillé ou sérum reporté.

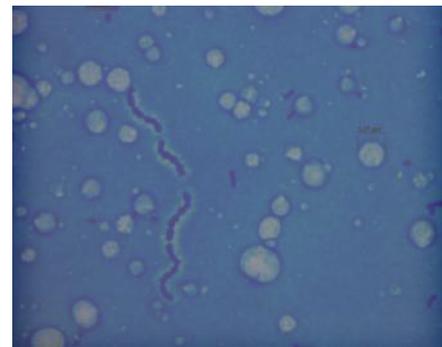
C'est parfois le matériel de fabrication qui devient source de ferments, de germes « positifs » pour ensemercer le lait. La gerle (cuve en bois), utilisée en salers, est la principale source de flore avec le lait cru lui-même.

Les germes lactiques du lait cru, des intrants (coagulants) sont également actifs lors de la fabrication. Ne venant pas des « ferments », ils sont appelés NSLAB, acronyme anglais pour ferments lactiques acidifiants non levains (Non Starter Lactic Acid Bacteria). On les retrouve dans de nombreuses pâtes pressées cuites et AOP où ils sont, pour partie, responsables de la typicité de ces fromages.

PRÉSENTATION DE FERMENTS : SOUCHES PURES

Un ferment « souche pure » est un ferment obtenu à partir d'une même cellule mère. Ses caractéristiques métaboliques sont précises, mais les ferments souches pures « s'usent » vite, leur hyper spécificité les rend sensibles aux attaques phagiques.

- du fait de sa spécificité génétique, de sa faible variabilité phénotypique, il est plus sensible aux phages, et les rotations phagiques sont limitées ;
- leur utilisation prolongée sans rotation est un risque important ;
- une attaque phagique se solde par un fort ralentissement/arrêt de l'acidification.



© ENILBIO - cocktail de souches

COCKTAIL DE SOUCHES

Il s'agit de mélange de souches : cela réduit la spécificité métabolique, mais renforce la résistance phagique, palie aux risques de mutation en cours de développement afin de garantir un maximum d'activité.

Un ferment indéfini est un mélange de nombreuses souches qui permettent d'avoir un résultat plus approximatif. Le contenu est moins « connu », mais leur biodiversité assure une moindre sensibilité phagique ;

- on peut donc les utiliser plus longtemps sans rotation phagique, mais des activités peuvent alors être réduites et/ou disparaître ;
- on observe plutôt des retards que des arrêts d'acidification lors d'attaques phagiques.

SOUCHES RAPIDES / SOUCHES LENTES

Les souches rapides sont des ferments capables de produire leurs propres facteurs de croissance (protéase +).

Les bactéries prot+ possèdent une protéase de paroi active en phase de développement qui leur permet de produire leurs propres facteurs de croissance (peptides et AC. aminés)

FERMENTS DÉFINIS

Un ferment défini est un mélange dont l'activité est connue, maîtrisée, en termes de potentiel d'acidification (vitesse d'acidification, valeur finale de pH), d'aromatisation ou autre caractéristique métabolique utile à la technologie.

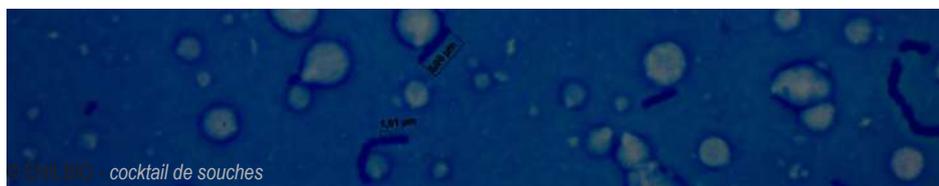
- il est en général constitué de quelques souches (2 à 3), dont le/les comportements sont bien connus ;

PIEDS DE CUVES ET NSLAB

Un pied de cuve est une culture reportée de caillé ou sérum de la veille. C'est une forme de repiquage, mais avec l'ensemble de la flore présente dans un caillé frais. On garde une quantité de caillé avant moulage (en technologie lactique), ou une quantité de sérum acidifié, pour ensemercer la fabrication future.

Les bactéries prot- possèdent un protéase cytoplasmique mais pas de paroi. La protéolyse aura donc lieu après la lyse de la cellule bactérienne. Ainsi, après utilisation des facteurs de croissance du milieu leur développement sera ralenti.

En cas de repiquage, on sélectionne progressivement des prot+, donc acidification de plus en plus rapide de cocktails de souches.



© ENILBIO - cocktail de souches

En jouant sur les proportions de souches prot+/prot-, les fournisseurs de ferments favorisent des acidifications rapides ou lentes pour quelques générations de ferments. Au delà de 5 à 6 générations, le milieu s'appauvrissant, les souches prot+ prennent le dessus, et l'acidification est plus rapide.

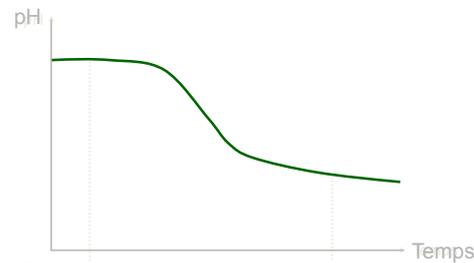
INTERPRÉTATION COURBES DE CROISSANCE

Une courbe de croissance se caractérise par 3 données essentielles :

- la durée de la phase de latence ;
- la pente de la courbe en phase de croissance exponentielle ;
- la valeur d'arrêt.

Avec ces trois éléments, en croisant les valeurs de pH et d'acidité Dornic, on peut interpréter quasiment toutes les origines d'un retard / excès d'acidification: dose de ferments, stress du ferment, condition de milieu (Température, pouvoir tampon, redox...), inhibitions (compétitions microbiennes, attaque phagique, résidus d'antibiotiques, d'antiseptiques). Le suivi de l'acidité Dornic permet de voir le travail des ferments par la production d'acide lactique.

Le suivi du pH est le reflet de la production d'acide lactique (ou autre) dans un milieu plus ou moins tamponné.



© ENILBIO - Cinétique d'acidification

LEXIQUE

Microbiote intestinal : c'est le nom donné à la flore intestinale humaine, germes avec lesquels nous vivons en symbiose

Acétaldéhyde : arôme typique des yaourts, c'est le goût « bulgare » ;

Diacétyl : goût de noisette, c'est l'arôme recherché dans le beurre ;

Lactique /enzymatique : ce sont les deux grandes familles de caillé en fromagerie. Le caillé lactique est perméable, acide, déminéralisé, humide. Le caillé enzymatique est plutôt neutre, minéralisé, contractile, imperméable.

HFD : Humidité du fromage dégraissé, valeur relative, indice de disponibilité de l'eau du fromage, indicateur d'aptitude à l'affinage du fromage au démoulage, aptitude à la conservation du fromage à l'emballage. se calcule par la formule : $(100 - EST) / (100 - MG) * 100$

EST : Extrait Sec Total

MG : Matière grasse

Perméabilité : correspond à un caillé plutôt lactique, ou la faible action de la présure et l'acidification précoce génère un caillé peu structuré, poreux, ayant une bonne aptitude à l'égouttage sponstanné.

Décret fromage : Le décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013 a été publié au JO le 14 novembre 2013. Il modifie le décret n° 2007-628 du 27 avril 2007. Il définit les ingrédients autorisés pour obtenir la dénomination fromage, ainsi que les grandes voies technologiques pour les fromages « définis ».



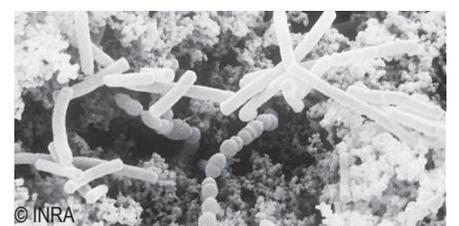
IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES FERMENTS LACTIQUES

Valérie MICHEL : Responsable du pôle microbiologie laitière - ACTALIA

Des méthodes basées sur des observations microscopiques et des aptitudes physiologiques (gammes de température de croissance, halotolérance, résistance à certains composés (H₂O₂, ...), l'identification des souches a été bouleversée par la connaissance des génomes. En effet, au niveau microbien, certaines séquences génétiques, comme celles codant pour le gène de ADN ribosomique 16S, sont spécifiques et relativement bien conservées au sein d'une même espèce. Il est ainsi possible, par comparaison des séquences codant pour l'ARNr16S issues d'une bactérie non identifiée aux séquences d'une souche de référence connue, de lui attribuer un nom d'espèce.

Ceci nécessite que la base de données de référence soit assez fournie pour trouver l'espèce équivalente ou l'espèce la plus proche. Cependant, il arrive, dans quelques cas, que cette technique d'attribution d'identité ne soit pas suffisante, ceci est vrai pour certaines espèces qui sont proches sur le plan phylogénétique, à l'exemple des *Lactobacillus* ou des *Bifidobacterium*. Pour cela, il est alors possible, par comparaison des séquences génétiques de ces sous-espèces, d'identifier des séquences génétiques spécifiques de celles-ci et de dessiner des amorces PCR qui permettront ensuite de facilement différencier ces espèces.

Il peut s'agir de PCR simple (discriminant un gène) ou de PCR multiplex (discrimination basée sur l'amplification de plusieurs gènes). Ainsi dans le domaine des bactéries lactiques, des séquences spécifiques pour identifier les espèces de *Lactobacillus*, à l'exemple des souches de *Lb acidophilus*, *Lb casei*, *Lb delbrueckii* ou de *Bifidobacterium longum*... ont pu être développées [Sheu et al., 2009].



Si les informations génétiques permettent d'attribuer une identité aux souches bactériennes, la question de la diversité des souches a son importance. Elle permet d'assurer, à travers la variabilité génétique des souches, une robustesse dans la mise à disposition de ferments, notamment vis-à-vis de la résistance aux phages.

La connaissance de la biodiversité génétique des souches est à déterminer également dans les campagnes de sélection et de mise au point d'un ferment pour cribler les souches et ainsi éviter de travailler, à l'extrême, sur les mêmes clones.

Diverses techniques peuvent être employées à ce niveau : elles sont basées sur le polymorphisme de l'ADN des souches, en mettant en évidence ces différences par l'utilisation d'enzymes de restriction qui coupent l'ADN sur des séquences déterminées puis par séparation par électrophorèse des fragments obtenus.

C'est le cas de la technique de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) ou Electrophorèse en champ pulsé. D'autres techniques, parmi les plus courantes, sont basées sur l'amplification de séquences d'ADN au hasard et séparation des amplifiats obtenus (technique du RAPD pour Random Amplification of Polymorphic DNA) ; d'autres se basent sur la mise en évidence de complexes clonaux, par l'amplification, le séquençage des amplicons et la comparaison de leur séquences pour 7 gènes de ménage (gènes du métabolisme des souches) : il s'agit de la technique de MLST (Multi Locus Sequence Type), notamment appliqué sur *Streptococcus thermophilus* [Yu et al. 2015].

Les différences entre les profils génétiques des souches peuvent ensuite être interprétées pour construire des arbres phylogénétiques qui regroupent les souches par sous-groupe de similarité plus ou moins forte.

L'évaluation de cette biodiversité génétique permet ensuite de réduire le panel de souches étudiées pour la détermination d'un critère particulier. Ceci est utile dans le processus de sélection d'un ferment.

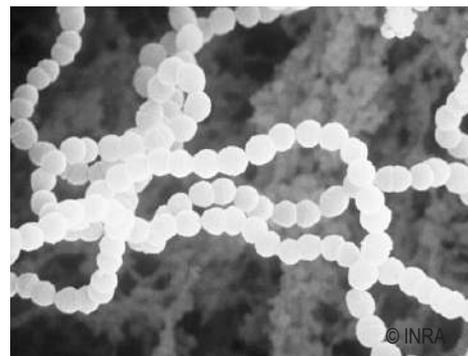
Les critères de sélection des ferments sont très variables, dépendant des conditions d'utilisation qui en sont attendues ; bien entendu, la détermination de la capacité acidifiante dans des conditions fixées en est le plus fréquent pour les bactéries lactiques (mais d'autres critères peuvent intervenir comme la production de métabolites secondaires et la production de CO₂ pour les souches hétérofermentaires.

Les critères de sélection concernent aussi la résistance des souches aux phages, mais aussi l'absence de gènes d'antibio-résistance et une capacité réduite à produire des amines biogènes, des procédures de sélection des souches vis-à-vis de ce critère ayant été proposées [Bover-Cid et Holzzapfer, 1999].

Enfin, en termes d'utilisation des bactéries en qualité de ferments, n'oublions pas que la question de l'innocuité des souches peut se poser.

Sur le plan réglementaire, l'utilisation de souches est basée sur l'appartenance à des listes positives, listes pour lesquelles les bactéries sont considérées comme étant sans danger : statut GRAS pour « Generally Recognized As Safe » aux USA, ou statut QPS pour « Qualified Presumption of Safety » au niveau de l'Union Européenne, avec des différences de procédures de reconnaissance des souches, qui peuvent être basées sur leur utilisation traditionnelle.

Un consensus mondial de souches utilisées communément dans les fermentations alimentaires, que celles-ci soient bactériennes ou fongiques, a par ailleurs été publié, il y a quelques années par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) et l'EFFCA (European Food and Feed Cultures Association) [Bourdichon et al, 2012].



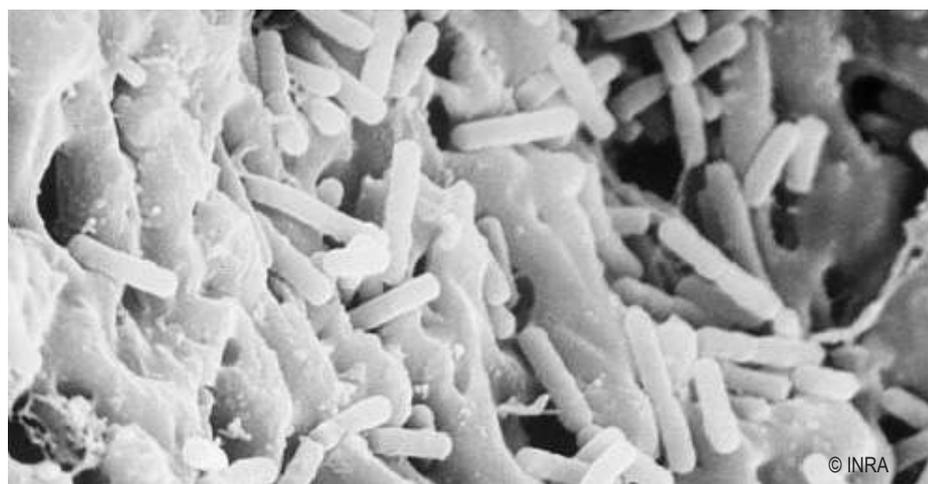
RÉFÉRENCES CITÉES :

Bourdichon F., Casaregola S., Farrock C., Frisvad J. Gerds M., Hammes W., Harnett J., Huys G., Laulund S., Ouwehand A., Powell I., Prajapati J., Seto Y., TerSchure E., Van Boven A., Vankerckhoven V., Zgoda A., Tuijelaars S., Hansen E. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 87-97.

Bover-Cid S. Holzzapfel WF. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33-41.

Sheu S., Hwang W., Chen H., Chiang Y., Tsen H. 2009. Development and use of tuf gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products. *Journal of Food Protection*. 72 : 93-100.

Yu, J. Liu W., Xi X. Song Y., Ly Q., Bao Q. Menghe B. Sun T. 2015. *Multilocus* sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from naturally fermented dairy foods in China and Mongolia. *BMC*. 26 : 236.



CRITÈRES DE CHOIX DES BACTÉRIES LACTIQUES

- JR. KERJEAN : Responsable scientifique - ACTALIA Produits laitiers

Pour exprimer ses besoins auprès des fournisseurs de ferments, le fromager doit utiliser une bonne méthode et donner les bonnes informations. Le fournisseur doit être étroitement à l'écoute du fromager. Sans ce dialogue, les exigences fromagères risquent de ne pas être bien comprises. Il faut utiliser la langue commune qui permet de traduire les contraintes technologiques en critères microbiologiques, pour la sélection. Mais si le fromager sait présenter ses besoins en termes de cahier des charges aboutissant à la construction de critères applicables au choix, alors une collaboration fructueuse se mettra en place avec les fournisseurs. Ce travail en commun peut aboutir non seulement à une qualité standard en évitant les défauts liés à des accidents (bactériophages...) et en assurant une bonne régularité, mais aussi à une production de fromages aux caractéristiques originales, liés notamment à l'aptitude des ferments à jouer sur la protéolyse, la lipolyse, sur le goût, la texture et l'arôme.

Avec un grand nombre d'étapes et de péripéties, c'est ce travail que l'ITG a mené, entre 1985 et 2008 avec les fournisseurs de ferments emmental. C'est aussi le cas de nombreux fromages collectifs en France qui ont suivi une démarche méthodique de choix et de sélection avec l'ITG-ACTILAIT. Cet article décrit cette démarche en privilégiant les exemples concrets et les expériences vécues.

Depuis le moment où les fromagers ont décidé de ne plus toujours s'en remettre aux micro-organismes du lait pour assurer l'acidification et l'affinage, le choix des ferments est devenu une étape cruciale de la réussite de la transformation fromagère.

A partir du moment où les seuls ferments ne sont plus ceux qui sont préparés à la fromagerie et que des entreprises spécialisées préparent les ferments, les relations techniques avec les fournisseurs de ferments, spécialistes des fermentations et de la microbiologie appliquée, se placent au centre du processus de choix des ferments.

C'est donc bien là, dans le cadre de ces relations techniques fromagers-fournisseurs, qu'il faut réaliser le choix des ferments de façon optimale. Il faut donc alors disposer d'une méthode éprouvée qui assure un bon choix des ferments parmi ceux qui sont proposés et qui assure aussi une diversité suffisante de souches et aptes à s'adapter aux contraintes du fromager (variables dans le temps, d'un atelier à l'autre etc).

L'objet des trois chapitres suivants est de décrire cette méthode,

- en s'appuyant sur des exemples d'expérience, en particulier celle de l'ITG et de la profession de l'emmental en France de 1985 à 2008;
- et en citant des exemples vécus et notamment ceux de l'unité microbiologie d'ITG-ACTILAIT à La Roche-sur-Foron (74) dirigée par Jean-François Chamba et actuellement par Valérie Michel.

I- LA DÉFINITION DES CONTRAINTES TECHNOLOGIQUES

Les micro-organismes qui doivent se développer dans le milieu fromage ont à subir un grand nombre de stress. Il faut décrire et pondérer précisément d'une part ces stress et, d'autre part, les objectifs technologiques que l'on exige des ferments.

C'est d'autant plus important que le fromager s'adresse à une entreprise extérieure qui sélectionne et prépare les ferments et qui n'a pas forcément la connaissance détaillée des priorités spécifiques à chaque technologie fromagère (avec ses évolutions) et à chaque atelier de transformation.

I-a Préparation du lait

Dans l'industrie, la concentration protéique du lait de fromagerie dépend de la stratégie de chaque unité industrielle. Pourtant cette préparation du lait va déterminer la manière dont les ferments vont être répartis dans le caillé.

Donc, un paramètre aussi important que la distribution spatiale de chaque ferment dans le caillé dépend de la stratégie de chaque entreprise. C'est au fromager de bien communiquer ce paramètre aux fournisseurs pour s'assurer qu'il est pris en compte dans la sélection.

On nomme l'ensemble des objectifs et stress les « contraintes technologiques » qui apparaissent dans tout cahier des charges et sont distinctes des méthodes microbiologiques de sélection.

Dans ce même domaine, la maturation du lait joue un rôle : lorsque les ferments sont bien répartis initialement dans le lait, on a toutes les chances qu'ils soient aussi bien répartis dans les fromages.

De plus, la maturation a souvent pour objectif une transformation limitée du lactose en acide lactique dans le lait conduisant à un pH légèrement plus bas que le pH initial du lait arrivant à l'usine, pH 6.63 contre pH 6,7 par exemple en emmental.



© TDB AOP

Cette acidification limitée impose que le ferment lactique choisi s'adapte à la température de maturation. Or, les modalités et températures de maturation du lait sont largement variables. On ne peut pas confondre une maturation en cuve 32 °C 1h avec une « pré-maturation » 12 °C 24h. Ce n'est pas le même stress, ce n'est pas la même contrainte technologique.

Souvent, la température basse de « pré-maturation » ne permet pas une croissance notable des bactéries lactiques mésophiles ; inversement la maturation en cuve est souvent remplacée dans l'industrie par le temps de remplissage qui pour des grandes cuves peut être important. Ainsi, la pré-maturation, ou plutôt le stockage en présence des ferments, très souvent, ne constitue pas une réelle maturation biologique, même si les conséquences chimiques peuvent ne pas être négligeables, surtout en pâtes molles (1).

Pour des ferments d'affinage (comme les bactéries propioniques), la question de la répartition initiale dans le caillé est peut-être encore plus importante que pour les ferments lactiques. L'ITG a confirmé qu'une insuffisante distribution des bactéries propioniques conduit à un nombre insuffisant de colonies, qui deviennent trop grosses en fin d'affinage. Ce phénomène conduit à favoriser le défaut « points bruns » de l'emmental. Avant de changer de souches, la solution consiste à vérifier avec le fournisseur de ferments propioniques que l'ensemencement est suffisant (6). Il faut aussi examiner le potentiel de coloration des souches (2).



I-b Égouttage, acidification

La technologie fromagère a pour but initial la concentration des éléments nutritifs essentiels du lait afin d'assurer leur bonne conservation et leur report d'une période à l'autre.

C'est la fonction de l'égouttage d'assurer cette concentration qui se traduit par l'expulsion plus ou moins poussée d'un lactosérum dont la composition minérale varie en fonction du niveau d'acidification, d'une technologie à l'autre et, pour une technologie donnée, au cours du développement de l'acidification.

Cette concentration est assurée par la coagulation puis par l'égouttage du coagulum qui en est issu.

Les conditions de l'égouttage sont différentes d'un type de fromage à l'autre : avec une forte acidification en fromage lactique avec une faible acidification en fromage présure.

Pour créer cette différence, c'est le triplet de contrôle [durée ; température ; choix des ferments lactiques] qui va jouer le rôle régulateur : pour les fromages lactiques la température basse et le temps long de coagulation vont permettre le développement de ferments lactiques mésophiles, à l'inverse pour les fromages présure l'acidification et l'égouttage mécanique puissant du coagulum à température plus élevée vont limiter le développement des ferments lactiques pendant l'égouttage et préparer l'acidification sous presse.

La conséquence de cette différence est que les ferments d'acidification d'un fromage lactique vont pouvoir bénéficier d'une disponibilité importante d'eau pendant l'égouttage et assurer une bonne acidification. A l'inverse, les ferments vont se retrouver rapidement, en fromage présure, dans un milieu à faible activité de l'eau.

Ainsi, le couple [égouttage ; acidification] est la première contrainte technologique que l'on doit transformer en critère microbiologique. On verra que cette tâche est complexe à réaliser, notamment il va être difficile de sélectionner les ferments lactiques suivant un seul critère simple d'acidification au laboratoire.



Pour répondre à cette contrainte, l'ITG a développé dans les années 1995 la mise au point d'une « mesure d'acidification polytechnologique » qui permet de reconstituer l'évolution de l'acidification en situation contrôlée dans un intervalle de temps de 40h (mesure de pH toutes les 5 minutes) et dans une suite de variations de température entre 15 et 45 °C. Un logiciel permet de reconstituer les courbes d'évolution du pH en fonction de n'importe quelle dynamique de température rencontrée en fromagerie (3, 5).

Cependant, rien ne remplace les essais fromagers dans ce domaine et c'est la raison pour laquelle les producteurs de ferments disposent de plateformes modèles sur lesquelles leurs ferments sont testés. C'est aussi la raison pour laquelle après la sélection au laboratoire (en appliquant les critères de sélection), on passe rapidement à la sélection en pilote, avant la confirmation en situation réelle des cuves de fromagerie chez l'utilisateur, qui reste le juge définitif.

Ce mode de raisonnement du couple [égouttage ; acidification] permet de définir des conditions d'aw, de pH, de durée et de température. Ce type de contrainte, à définir technologie par technologie, est valable dans le champ global allant des pâtes fraîches aux pâtes pressées non cuites. Cependant le chauffage en cuve pour les fromages à pâte cuite introduit une discontinuité dans le raisonnement des contraintes technologiques fromagères.

I-c Exemple du chauffage en cuve

Des pâtes fraîches aux pâtes pressées cuites, la température utilisée en cuve constitue une des contraintes unitaires à prendre en compte pour décrire la contrainte globale de fabrication (durée, pH, température, aw). A partir des pâtes pressées demi-cuites et surtout des pâtes pressées cuites, le chauffage en cuve devient une contrainte majeure et relativise les autres.

C'est sans doute l'évolution progressive des pâtes pressées en région de montagne qui a contribué à rechercher des fromages de plus grande taille et se conservant plus longtemps. Cela a sans doute amené les fromagers à monter progressivement la température d'égouttage des pâtes pressées pour atteindre plus de 50 °C qui définit les pâtes pressées cuites, 52 °C 1 h pour l'emmental traditionnel : bien que des nuances dommageables aient été introduites récemment à la demande des fromagers allemands dans la définition du codex, ce niveau minimal de 50 °C est universellement admis pour la définition des fromages à pâte pressée cuite⁽⁴⁾.

Le chauffage du mélange caillé-sérum en cuve pendant environ 30 min, 1h en traditionnel, a pour conséquence une courbe de descente en température qui souvent atteint 30 °C en moyenne en 18 h. Cette courbe typique, varie évidemment d'un fromage à pâte pressée cuite à l'autre (chauffage plus élevé en parmesan, refroidissement plus rapide en emmental industriel etc.) mais surtout d'une entreprise à l'autre. C'est un paramètre de fabrication très souple qui permet de moduler l'évolution de l'acidification pendant le pressage et donc la minéralisation du réseau protéique.

Pour résoudre cette question, un consensus professionnel est nécessaire. C'est l'expérience qu'a pratiqué l'ITG entre 1985 et 1995 dans la construction du protocole de contrôle des bactéries lactiques. Revenons sur cette expérience importante du point de vue de la compréhension des relations fromageries / fournisseurs de ferments lactiques⁽⁵⁾.

I-d L'expérience du cahier des charges emmental appliqué à l'acidification

En 1985, les emmentalistes rassemblés au groupe Ouest de l'ITG se sont plaints du fait que les fournisseurs de ferments lactiques thermophiles (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis*, *Lactobacillus helveticus*) ne prenaient pas suffisamment en compte les contraintes technologiques spécifiques de leur fromage emmental. Après discussion, il s'est avéré que les points suivants n'étaient pas correctement traités :

- performances d'acidification sous presse en emmental;
- potentialités protéolytiques en affinage,
- résistance aux bactériophages (notamment parentés phagiques).

Trois points auxquels devaient évidemment s'ajouter les critères classiques de pureté, d'innocuité, de sécurité sanitaire, de dénombrement vérifiable. Enfin le sentiment de ne pas maîtriser la composition des cocktails commercialisés donnait au fromager une impression de ne pas bien connaître son approvisionnement d'un lot à l'autre, des rotations étant parfois pratiquées sans information.

La première question, l'acidification, naissait du fait que les fournisseurs de ferments n'avaient pas une vue claire de la contrainte technologique emmental liée à l'évolution spécifique de la température en cuve puis sous presse.

En 1986-88, l'ITG a visité l'ensemble des producteurs installés en France pour leur expliquer ce fait et demander à ce que une collaboration soit entreprise pour tenir compte du diagramme durée x température de l'emmental en cuve et sous presse. Bien entendu les fournisseurs, qui ne demandaient pas mieux que de satisfaire leurs clients, ont demandé quelle méthode de contrôle utiliser pour prendre en compte cette demande.

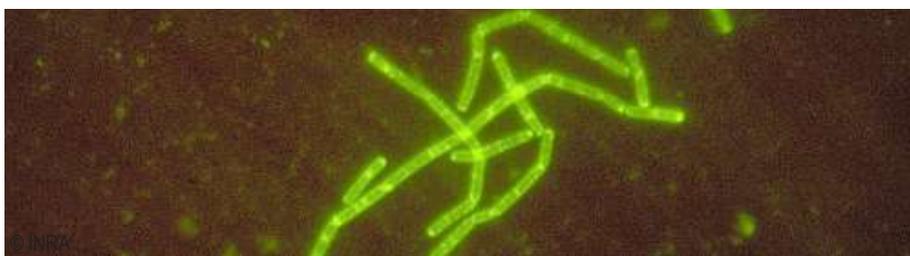
Cette réponse des fournisseurs est particulièrement importante du point de vue méthodologique : il n'est pas suffisant d'émettre une demande auprès des fournisseurs pour qu'elle puisse être satisfaisante, encore faut-il que cette demande puisse être prise en compte au laboratoire de sélection et de contrôle.

Ainsi, pour le cycle thermique de l'emmental, les professionnels ont compris qu'il fallait se mettre d'accord sur un « cycle moyen » (32 °C 40 min, montée à 53 °C en 45 min, 53 °C 40 min, descente à 30 °C en 18 h, 30 °C pendant 4h) qui traduit les dynamiques les plus courantes en emmental, quitte à adapter ensuite ce cycle aux autres fromages à pâtes cuites, aux autres types d'emmental, voire à chaque unité de fabrication si besoin.

En précisant les conditions d'inoculation, le type de lait stérilisé, les modalités de programmation d'un bain-marie adapté à la reconstitution du cycle thermique, la mesure du pH etc, l'ITG a proposé des résultats minimum d'acidification et permis aux fournisseurs de répondre précisément à la demande des professionnels.

Dans les faits, cela a amené les fournisseurs de ferments lactiques thermophiles à créer un nouveau critère de sélection car le classement des souches thermophiles suivant le pouvoir acidifiant classique à 44 °C et suivant le cycle thermique de l'emmental était différent comme l'a montré Florence Prost en 1989⁽⁷⁾. Ainsi des cocktails de bactéries lactiques thermophiles très acidifiants à 44 °C se sont révélés très peu acidifiants en utilisant le cycle thermique de l'emmental.

Plus précisément encore, lors de la rotation et de la constitution d'un nouveau cocktail apparaissant sous la même référence, avec un numéro de lot différent, le fournisseur remplaçait une souche qui donnait une bonne acidification à 44 °C et en cycle thermique par une souche qui donnait une bonne acidification à 44 °C mais pas en cycle thermique, remettant en cause l'acidification non pas en yaourts ou en fromage à pâte pressée, mais spécifiquement en emmental en raison du chauffage à 52 °C.



La profession emmental et l'ITG espérait en 1990 que l'ensemble des fournisseurs de ferments lactiques thermophiles satisfaiseraient à la contrainte technologique du cycle thermique et l'utiliseraient comme un critère de sélection permettant aux emmentalistes de disposer de souches variées mais passant bien le cycle thermique. Cela n'a hélas pas été le cas immédiatement. C'est la raison pour laquelle l'ITG a choisi de constituer et de tester au laboratoire puis en fromagerie, un soucier bactéries lactiques thermophiles. Une fois cette sélection terminée, le soucier opérationnel constitué de souches pures bien connues pouvait être produit puis commercialisé comme ferments dans de bonnes conditions.

La profession emmental a proposé cette production à l'ensemble des fournisseurs et la société Laboratoires Standa (Caen) a conclu de 1995 à 2008 un accord de production, de collaboration technique et d'apports mutuels avec l'ITG. Cet accord a permis de mettre sur le marché des souches pures de *S.thermophilus* et de lactobacilles thermophiles possédant des aptitudes variées et répondant aux différentes exigences des fromages d'emmental.

Ainsi, on voit par cet exemple historique comment

- une contrainte technologique, la température d'acidification en emmental, est devenue
- un critère microbiologique de laboratoire, un critère de sélection, a abouti à
- un cahier des charges pour tous les fournisseurs,
- un soucier de référence professionnel, puis à
- une production de ferments thermophiles choisis dans ce soucier.



© ENIL MAM



II- DE LA CONTRAINTE TECHNOLOGIQUE AU CRITÈRE MICROBIOLOGIQUE

De la fromagerie au labo : comment les demandes du fromager passent au laboratoire pour être appliquées à des souciers pertinents ? Telle est la seconde question qu'il importe de traiter dans le domaine du choix des ferments de fromagerie.

Cela peut mener très loin du point de vue de la recherche en biologie moléculaire, puisqu'on verra que seule l'identification des protéases de paroi des lactobacilles thermophiles a permis de régler en 2015 un problème posé à l'ITG par les professionnels de l'emmental trente ans avant. Mais ici, on s'attachera à décrire uniquement la partie utile à la fromagerie en reportant les microbiologistes spécialisés aux publications de l'ITG (puis de l'ITFF et d'ACTILAIT).

II-a La question du soucier de base

La question de la constitution de la collection de souche (soucier) sur laquelle on opère la sélection en appliquant les critères microbiologiques a souvent été considérée comme peu importante. L'essentiel pour certains microbiologistes était de rassembler des souches d'une même espèce en maximisant la variabilité.

Cependant, l'expérience prouve aux sélectionneurs qu'il est toujours profitable de choisir des souches qui ont déjà subi des stress fromagers. Ainsi, dans le soucier bien connu de *Clostridium tyrobutyricum* rassemblé autrefois par Jean-louis Bergère (Inra Jouy-en-Josas) ce sont les souches issues de fromages défectueux qui possèdent la capacité de germer aux pH d'ensilage et aux pH bas (pH 5-5.5), critère majeur pour leur aptitude à la germination dans les fromages.

De même, les souches de bactéries lactiques de l'ITG possèdent l'immense avantage de provenir de situations fromagères.

Enfin, les 25 souches de *Propionibacterium freundenreichii* ⁽⁸⁾ récoltées dans les années 1980 par l'ITG, sélectionnées en 1984-1994 (souches propriétés du CNIEL) proviennent non du lait mais de fromages de bonne qualité (bonne ouverture, un taux élevé d'acide propionique, pas d'ensemencement) : c'est pourquoi ces souches constituent un ensemble de référence où la profession fromagère a trouvé des diversités de performances intéressantes. Ces souches ont démontré leur potentiels variés (production d'acides acétique et propionique, production de gaz) et leur résistance aux stress (conservation des fromages, résistance au sel) lorsqu'elles ont été testées en grande série sur fromages miniatures avec 5 répétitions. La collection de 25 souches ITGP1 à ITGP25 ainsi caractérisées a été largement valorisée auprès des fromagers. Pour se rendre compte de la masse de travail que représente une telle sélection il suffit de savoir que ce travail de sélection a représenté un investissement de 200 000 euros (2016) par souche de bactérie propionique sélectionnée (financement SIGF-Région Bretagne).

Des cas inverses existent en effet : ainsi, Florence Prost a démontré dans le cadre du projet européen Pab Lab 1996-2000 ⁽¹⁴⁾ que seules les souches aptes à sporuler à bas pH sont aptes à germer au pH du fromage. Seules quelques souches de collection possèdent cette propriété.

Ainsi, il importe beaucoup à l'avenir de la sélection de bien réfléchir à l'origine des souches avant de les collecter, les conserver puis leur appliquer les critères de sélection.

Dans tous les cas, les souches récoltées en conditions fromagères ont plus de chance d'être intéressantes, typiques et particulières pour la fromagerie que les souches prélevées ailleurs.



© ENILBIO

II-b L'aptitude protéolytique des ferments lactiques

La deuxième exigence de la fromagerie d'emmental dans les années 1985 était de pouvoir utiliser les ferments lactiques thermophiles, essentiellement *Lactobacillus helveticus*, comme apport de potentiel protéolytique en affinage. La protéolyse doit être séparée en protéolyse primaire, qui décrit la première coupure des caséines, et protéolyse secondaire qui aboutit à la formation de petits peptides à partir des fragments de caséines.

Un long travail a été mené à l'ITG pour définir une méthode reproductible, discriminante et validée de mesure du potentiel protéolytique primaire (caséolyse) des lactobacilles thermophiles, dont tous les éléments amenaient à penser qu'il s'agissait d'un phénomène essentiel⁽⁹⁾. Les techniques utilisées n'ont pas permis d'obtenir des résultats valides utiles en fromagerie.

Il a fallu attendre l'utilisation par l'Inra de méthodes moléculaires qui ont permis d'isoler et d'identifier les protéases de paroi des lactobacilles thermophiles pour maîtriser la mesure du potentiel de caséolyse. Aujourd'hui, les techniques mises au point par INRA STLO autorisent la sélection de lactobacilles thermophiles en fonction de leurs protéases, qui déterminent leur aptitude à la protéolyse primaire. Cette activité influence les thermofonctionnalités de l'emmental (cf travaux de l'UMT Caseolis⁽¹⁰⁾).

Cet exemple montre qu'il ne suffit pas de savoir qu'une propriété des ferments est particulièrement apte à répondre à une exigence pour pouvoir agir sur cette propriété.

Un critère microbiologique répondant à une contrainte technologique suppose aussi que des méthodes microbiologiques soient opérationnelles au laboratoire. Et ces méthodes doivent remplir de nombreux critères avant leur dissémination et leur utilisation :

- reproductibilité,
- aptitude à la discrimination des souches,
- pouvoir être utilisées sur de séries de souches suffisantes (méthodes utilisables pratiquement),
- et surtout que leurs résultats soient validés en fromagerie.



© ENILBIO

Contrairement à la protéolyse primaire, cette difficulté méthodologique ne s'est pas manifestée pour la mesure de la protéolyse secondaire puisque une méthode de référence a été rapidement mise au point par Florence Prost et JF Chamba⁽¹¹⁾. L'aptitude à produire des acides aminés (aptitude aminopeptidasique) est particulièrement nécessaire en fromagerie puisque c'est ce processus qui détruit les peptides amers.

La présence d'amertume dans le fromage est souvent très liée au manque d'activité aminopeptidasique. La mesure ITG de l'activité Leucine - Amino - Peptidasique (LAP) des lactobacilles thermophiles est simple, reproductible et discriminante. Lorsqu'on teste des ferments LAP++ sur des fromages dont les frères sans ferments LAP++ sont amers, l'amertume disparaît prouvant bien que la signification de la méthode est validée.

Détail important : de manière générale les microbiologistes avaient l'habitude de mesurer l'aptitude aminopeptidasique LAP dans les conditions de pH optimales, c'est-à-dire à pH 7 et 40 °C.

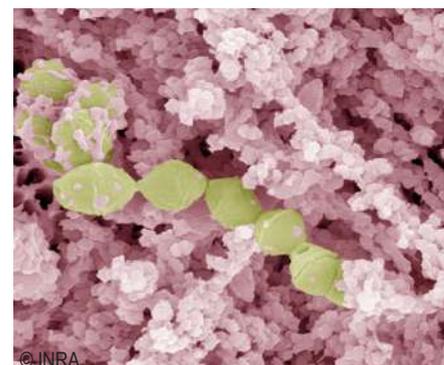
Or, les différences d'activité LAP à pH 7 ne correspondent pas à l'activité « désamérisante » réelle des *L. helveticus* dans les fromages. Florence Prost⁽¹¹⁾ a imaginé de mesurer la LAP au pH et à la température du fromage : pH 5.5 20°C. Dans ces conditions, la mesure de LAP correspond au potentiel réel désamérisant des souches de *L. helveticus*. De plus, une souche ayant un fort potentiel LAP à pH 7 n'a pas nécessairement un fort potentiel LAP à pH 5.5. L'ordre des souches n'est pas le même suivant les deux méthodes (pH 7 ou pH 5.5).

Ainsi, pour passer d'une contrainte technologique à une méthode de laboratoire il faut tenir compte des conditions fromagères au laboratoire, en particulier les conditions de pH et de températures doivent être celles du fromage.

Cette activité LAP pH5.5 est largement mesurée aujourd'hui sur les souches de *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* et surtout *L. helveticus* et donne, dans la pratique, de bons résultats en termes de maîtrise des éléments de base du goût.

II-c Les interactions

Les interactions streptocoques x lactobacilles en emmental, leuconostoc x penicillium en camembert sont bien connues. On ne sait pourtant pas si ce type d'interactions peut être utilisé comme critère de sélection. Faut-il oui ou non sélectionner des couples, voire des triplets de souches pures qui aboutiraient à des résultats positifs par leurs interactions ? Il se trouve que la pratique de la sélection et du choix des ferments n'a pas complètement répondu positivement à cette proposition. L'interaction lactobacilles x propionique en emmental en est un bon exemple.



© INRA

Développant les résultats de La Roche sur Foron en 1994, le programme européen PabLab1996-2000 ⁽¹³⁾ a montré que des lactobacilles thermophiles inhibaient ou accélèrent la fermentation propionique.

Ces résultats concernant des souches commercialisées et ayant été largement communiqués on aurait pu penser que les fromagers allaient choisir les couples lactobacilles x propioniques donnant les résultats les plus positifs. Or, ce n'est pas ce qui est arrivé. Le choix des fromagers s'est massivement orienté vers les souches de bactéries propioniques les plus résistantes à l'interaction.

Ce phénomène marketing très net a deux conséquences techniques très importantes sur le choix des ferments de fromagerie :

1) Lorsqu'on a le choix entre, d'un côté, une situation très performante mais très rigide, imposant des choix de souches peu flexibles, et, de l'autre côté, une situation tout à fait acceptable du point de vue des performances, moins explosive mais plus souple, un grand nombre de fromagers préfèrent la seconde solution qui leur laisse des possibilités de flexibilités : par exemple ici choisir un ferment propionique robuste permet un choix large de lactobacilles s'adaptant à différentes situations. Il faut donc probablement éviter de systématiser le principe de couples ou triplets de souches entretenant des relations positives et probablement privilégier des ensemencements plus robustes permettant une flexibilité plus grande.

2) La raison de ce choix est probablement la « sur-spécification » des ferments qui résulte du fait que plusieurs contraintes sont appliquées sur la même souche. Il ne faut pas trop demander à une seule souche. Il n'existe pas de souche miracle qui réponde à toutes les exigences. Comme les fromagers et les producteurs sont parfaitement conscients de ce danger de « sur-spécification » des ferments, il faut parfois faire marche arrière et concentrer l'attention sur une seule priorité, qui va être la qualité principale du ferment en question.



© ENILBIO

Cela permettra au fromager de choisir cette souche en connaissance de cause, sans empêcher l'utilisation parallèle d'autres souches. Ce raisonnement aboutit à un ensemencement complexe, mais on va voir dans le chapitre suivant que les conditions actuelles de production, en tout cas en France, tendent en effet vers un ensemencement plus riche en nombre de souches et d'espèces.

Dernier exemple : les qualités probiotiques des ferments (par exemple celles de propionibactéries ⁽¹³⁾) correspondent à une sélection très particulière qui inclut de très coûteux essais cliniques. Dans la même ligne que ci-dessus, on peut difficilement demander à une même souche de posséder des aptitudes technologiques et des qualités probiotiques (exemple de la souche ITGP20).

II-d Les ferments inhibiteurs de flores indésirables

Les bactéries lactiques possèdent plusieurs mécanismes d'inhibition des flores indésirables. Si l'on prend l'exemple de l'inhibition de la fermentation butyrique par le blocage de la germination puis de la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* on se rend compte clairement des avantages possibles et des problèmes liés à l'utilisation de cette inhibition. L'ITG à Rennes a confirmé en 1994 ⁽¹⁴⁾ que des streptocoques thermophiles, des lactocoques et des lactobacilles mésophiles pouvaient inhiber au laboratoire et en plateforme expérimentale des souches typiques de *Clostridium tyrobutyricum* qui donnaient des fermentations butyriques intenses (600 mg/100g d'acide butyrique).

Cependant, ces ferments, en fromagerie de taille réelle, n'inhibaient pas la fermentation butyrique due aux mélanges de souches se trouvant dans le lait réel d'une grande fromagerie.

Certes, en 1996, la coopérative laitière Valio a breveté un lactobacille rhamnosus inhibiteur de *Clostridium tyrobutyricum* ⁽¹⁴⁾. Cette souche a eu un certain succès commercial. Récemment dans le cadre d'un programme régional, Actilait à Rennes a vérifié qu'une souche analogue n'inhibait pas toutes les souches butyriques fromagères de référence en laboratoire. ⁽¹⁴⁾.

En suivant l'hypothèse de Bergère, on peut supposer que les ferments inhibiteurs sont très spécifiques et n'ont pas un spectre assez large pour être utilisée au stade industriel. Cette réflexion vaut probablement également pour les souches inhibitrices de *Listeria* proposées sur le marché comme l'avait noté JF Chamba en 2008 ⁽⁵⁾. Dans ce domaine où la recherche est intense on peut cependant s'attendre à des progrès et de nouvelles propositions.

Ce bilan mitigé de l'inhibition des microflores indésirables par les bactéries lactiques semble actuellement partagé au niveau industriel, mais nuancé au niveau artisanal où certains succès indéniables sont notés par les observateurs (cas Orval ⁽¹⁴⁾).

III- BACTÉRIOPHAGES ET ARÔMES SONT LES DEUX QUESTIONS COMPLEXES QUI DOMINENT LA SÉLECTION

III-1 Les bactériophages

La protection contre les accidents d'acidification dus aux bactériophages a deux aspects :

- la prévention de l'infection et de la dissémination des bactériophages ;
- le choix de ferments comprenant des souches résistantes (ou partiellement résistantes) aux bactériophages.

Les premières mesures sont bien connues : aseptie dans la préparation des ferments pour ensemencement des cuves à levains, lutte contre les contaminations croisées dans la préparation des levains, désinfection des équipements, optimisation des flux de personnes, éloignement des lieux de traitement du sérum. Dans tous les cas l'ensemencement direct (ou l'ensemencement direct des cuves à levains) limite très grandement le risque et il est probable que notamment pour cette raison ce type d'ensemencement se développe rapidement.

Le choix de ferments constitués de souches résistantes aux bactériophages, ou en tout cas de souches les moins sensibles aux bactériophages, lui, suppose que la sensibilité des souches aux principaux bactériophages présents soit bien connue. Or cette connaissance des bactériophages suppose de suivre en permanence la contamination de la fromagerie et des fromageries du pays.

Depuis longtemps, l'ITG (puis qACTILAIT) s'est attaché à identifier et caractériser morphologiquement et génétiquement les bactériophages présents dans les fromageries, permettant ainsi aux fromagers et aux fournisseurs de tester leurs souches faces à ces bactériophages les plus courants ⁽¹⁵⁾.

Ce tableau de phage connus, actualisés, répertoriés, caractérisés par familles aide beaucoup à pratiquer les rotations parmi les ferments lactiques utilisés. On recommande généralement dans une fromagerie donnée d'utiliser des souches d'une même « famille » par rapport aux bactériophages et d'éviter une trop grande variabilité des souches dans l'atelier qui favorise l'apparition de nouveaux bactériophages.

Dans tous les cas, quel que soit l'option choisie, la réflexion du fromager en commun avec le fournisseur ferments doit s'effectuer au moment du choix sur la base des aptitudes technologiques (acidification, protéolyse, arôme) croisée avec la résistance aux bactériophages.

Il y a souvent des compromis à faire. En particulier, l'expérience montre qu'on doit souvent abandonner des souches potentiellement enrichissantes pour des raisons de sensibilité aux bactériophages.

III-2 Choix des ferments et développement de l'arôme

En dehors du choix des levures et moisissures, important en pâtes molles et en bleus (par exemple, le choix majeur de *Geotrichum candidum* en camembert) qui dépasse le cadre de ce texte, le rôle des « diacetylactis » (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*) est particulièrement important car ces souches sont vraiment des ferments aromatisant utilisés en pâtes fraîches et en pâtes molles mais aussi parfois en pâte pressées. On a vu le rôle particulier de *Lactobacillus helveticus* en emmental pour assurer une protéolyse « fine », cette espèce thermophile est aussi choisie souvent dans ce but en pâte pressée et en pâtes filées.

Un des exemples les plus développés -notamment par l'ITG et l'INRA STLO ⁽¹⁶⁾- est le rôle aromatisant des bactéries propioniques.



© wk

Les bactéries propioniques possèdent trois aptitudes à transformer la matrice fromagère qui les rendent particulièrement aptes à produire des composés d'arôme.

Tout d'abord les bactéries propioniques sont productrices d'acide propionique qui a un rôle dans le développement des arômes doux, sucrés etc de certains fromages comme certains types Maasdam

De plus, les bactéries propioniques peuvent transformer certains acides aminés comme l'isoleucine en composés d'arôme (catabolisme des acides aminés). L'acide isovalérique (ethyl butyrique) est connu par exemple pour son rôle dans l'arôme « fort » des fromages (« étable », « vache »). Certaines souches de la collection ITGP1 à ITGP25 du CNIEL ont des propriétés claires de ce point de vue et peuvent renforcer nettement l'arôme des fromages trop « plats ».

Enfin, les bactéries propioniques ont un équipement lipolytique particulier qui leur permet d'être à l'origine de la lipolyse limitée qui a lieu dans l'emmental ou dans d'autres fromages où ils peuvent se développer. Outre leur rôle direct, les acides gras libres produits peuvent rentrer dans la formation d'esters qui jouent sur l'arôme fruité des fromages.

Ainsi, pour l'emmental, mais aussi pour d'autres pâtes pressées cuites et de nombreuses pâtes pressées non cuites, les bactéries propioniques du type *Propionibacterium freundenreichii* sont un outil majeur pour la formation d'un arôme équilibré. En utilisant des cocktails de souches propioniques adaptés, un bon équilibre entre les différentes composantes de l'arôme peut être atteint. Cet ensemencement propionique se développe de façon d'autant plus contrôlée dans les fromages hors emmental qu'il existe des soucheurs de bactéries propioniques bien caractérisées de ce point de vue aromatique grâce à l'utilisation de l'« aromathèque » des fromages développée par l'ITG dans le cadre de PabLab1996-2000 ⁽¹²⁾.

CONCLUSION

Plusieurs exemples ci-dessus ont montré que le fromager doit choisir les contraintes technologiques particulières à son process fromager. L'exemple du chauffage en cuve qui peut varier largement de 50 °C à 55 °C montre que la contrainte technologique doit être précisée et que le critère de choix doit épouser cette contrainte.

Le critère microbiologique répondant à ce chauffage doit se traduire au laboratoire (ou en plateforme) par une méthode qui soit reproductible, discriminante, utilisable par les laboratoires de routine et surtout validée en fromagerie. Pour assurer cette validation, il est utile de chercher à reproduire au laboratoire les conditions de la fromagerie en particulier les conditions de pH et de température.

Pour les conditions de disponibilité de l'eau (Aw), la sélection ne peut se passer des plateformes expérimentales et des minifromagerie qui reproduisent à petite échelle la technologie réelle.

Ces plate-formes autorisent aussi de grands nombres de répétitions qui permettent seule de s'assurer des résultats de sélection et des validations. Dans tous les cas le « juge de paix » reste la cuve de la fromagerie et le résultat qualitatif obtenu par le fromager. Ces essais de fromagerie doivent être organisés par une collaboration entre le fromager et le fournisseur de ferments, avec éventuellement l'appui d'un centre technique, de façon à ne pas obérer le fonctionnement de la fromagerie tout en obtenant un nombre suffisant de résultats pour pouvoir décider en toute connaissance de cause.

On demande souvent beaucoup aux souches de ferments ou aux cocktails de souches : acidifier, jouer positivement sur la protéolyse, favoriser les flores d'affinage positives, inhiber les ferments d'affinage, voire posséder des aptitudes santé. C'est souvent trop.

Il vaut mieux concentrer son attention sur une qualité principale pour une souche, quitte à complexifier un peu l'ensemencement. Un ferment inhibiteur ne remplacera de toute façon pas les procédures d'hygiène et d'épuration du lait. Un ferment activateur ne rendra pas un ferment d'affinage plus favorable à l'arôme.

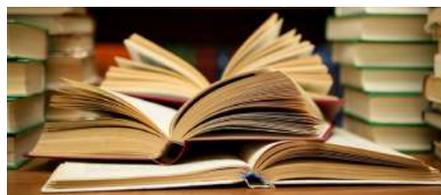
L'appauvrissement de la flore initiale du lait en fabrication artisanale semble inéluctable, les process industriels eux aboutissent à quasi stérilisés le lait (microfiltration, traitement thermique élevé) : l'ensemencement sera sans doute de plus en plus en plus complexe, faisant appel, comme JF Chamba l'avait prévu ⁽¹⁷⁾, à des souches secondaires de plus en plus nombreuses qui ne sont encore pas clairement identifiées, même si elles sont largement utilisées. Cette utilisation pratique (parfois un peu à l'aveugle) pose d'importantes questions aux spécialistes. Une action de recherche déterminée sur les « adjuncs culture » et notamment les souches appelées communément « bactéries lactiques non ferments » (NSLAB) est tout à fait d'actualité.

Dans ce cas l'attention au choix des ferments sera encore plus important que maintenant.

A partir du moment où la sélection, la préparation et la production des souches de ferments sont confiés à une entreprise spécialisée, le fournisseur de ferments, le dialogue technique entre le fromager et le fournisseur est le point crucial de la réussite du choix des ferments. Ce dialogue se passe dans des conditions différentes en fonction de la taille de l'entreprise. Pour les grands groupes, des microbiologistes spécialisés créent avec les fournisseurs des relations bilatérales sur la base du process de sélection. En revanche, l'attention du fournisseur doit être portée sur les fromageries artisanales où le dialogue ne doit pas se réduire à un argument commercial. C'est là que le fournisseur de ferments doit pouvoir analyser les besoins du fromager et les traduire en termes de souches proposées. Cela suppose une bonne connaissance technologique des représentants de fournisseurs et surtout une disponibilité d'écoute.

La contrepartie de l'analyse des besoins par le fromager doit être l'écoute par le fournisseur.

Pour les fromages traditionnels, l'action interprofessionnelle est indispensable car elle permet un travail de sélection avec une collaboration allant jusqu'à la production. Des exemples très réussis d'une telle démarche collective professionnelle de sélection des ferments en fromage traditionnels abondent en France et à l'étranger.



RÉFÉRENCES

1) JF Chamba 1975 La maturation des laits à gruyère Étude de la maturation longue à basse température ITG S 1975/5/B 12 pp
 JF Chamba 1989 La maturation dirigée. Effets des paramètres de la maturation sur l'acidification, l'égouttage, le rendement et la qualité de l'emmental. ITG ZS 1989/11/B 28 pp

O Sgard 2013 De l'importance des levains naturels pour la fabrication de l'emmental de Savoie Revue des ENIL 326 10

2) D Fesslerer, M Casey, Z Puhon 1999 Identification of propionibacteria isolated from brown spots of Swiss hard and semi-hard cheeses Lait 79 211.

3) JF Chamba, C. Duong, A Fazel, F Prost 1994 Sélection des souches de bactéries lactiques. Bactéries lactiques Ed Loriga Uriage. Chapitre III-2. 499.
 MA Chopard, JF Chamba 1994 Activité acidifiante polytechnologique des bactéries lactiques Colloque Lactic 94 (Caen) poster.

4) JR Kerjean, HP Bachmann, T Cogan 2001 Cooking temperature of whey and curd during Emmental cheesemaking. Milchwissenschaft 56 556.

5) F Prost, JF Chamba 1989 Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite Lait 69, 417

F Prost, JF Chamba 1991 Sélection de bactéries lactiques thermophiles pour la fabrication des fromages à pâte cuite, du laboratoire à la cuve de fabrication Colloque Lactic 91 Caen 307 Chamba JF 2008 Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In: Bactéries lactiques De la génétique aux ferments Ed Tec & Doc Lavoisier 787

6) R Richoux, A Thierry, MN Madec 1994 Croissance des bactéries propioniques dans le fromage Comparaison de deux milieux de dénombrement Lait 74 161

7) F Prost 1989 Évaluation des aptitudes technologiques des ferments lactiques thermophiles destinés à la fabrication des fromages à pâte pressée cuite. Thèse Université Claude Bernard Lyon 1 219 pp
 R Richoux 2013 Protéases de *Lactobacillus helveticus* et leurs conséquences sur les propriétés culinaires de l'emmental. Revue des ENIL 324 8

8) R Richoux, JR Kerjean 1993 Aptitude technologique de souches pures de bactéries propioniques Etude en minifabrication de fromages à pâte cuite ITG ZO 1993/10/C - 30 pp

- R Richoux, E Faivre, JR Kerjean 1994 Influence d'un report de longue durée à basse température sur l'aptitude technologique de souches pures de bactéries propioniques Etude en mini fabrication de fromages à pâte cuite ITG ZO 1994/10/C - 33 pp
- R Richoux, JR Kerjean 1995 Caractérisation technologique de souches pures de bactéries propioniques : test en mini fabrication de fromages à pâte cuite. Lait 75 45
- R Richoux, E Faivre, JR Kerjean 1998 Effet de la teneur en NaCl sur la fermentation du lactate par *Propionibacterium freudenreichii* dans les mini-fromages à pâte cuite Lait 78 319
- R Richoux 2006 Les bactéries propioniques Laitières Éditions Laboratoires Standa (Caen) Version française et version anglaise, 130 p
- 9) S Fournier (1992) Les paramètres de la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite. Etude sur un fromage modèle ITG DC 1992/10/B 62 p
- 10) R Richoux, L Aubert-Frogerais, G Rosset, JR Kerjean 2009 Impact of the proteolysis due to *Lactobacilli* on the stretchability of Swiss-type cheese Dairy Sci Technol 89 31 L Sadat-Mekmene, R Richoux, L Aubert-Frogerais, MN Madec, C Corre, M Piot, J Jardin, S Le Feunteun, S Lortal, V Gagnaire 2013 *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses J Dairy Sc 96 1455 V Gagnaire, S Lortal, A Thierry 2015 Recent advances on *Lactobacillus helveticus*, a lactic acid bacterium with peculiar proteolytic system FIL IDF Cheese Symposium Dublin 12 avril 2015
- 11) F Prost, JF Chamba 1994 Effect of Aminopeptidase Activity of Thermophilic Lactobacilli on Emmental Cheese Characteristics J Dairy Sc 77 24
- 12) JF Chamba 1994 Interactions entre lactobacilles thermophiles et bactéries propioniques. Influence sur les caractéristiques de l'emmental Colloque LACTIC 94 (Caen) 267
- JR Kerjean, S Condon, R Lodi, G Kalantzopoulos, JF Chamba, S Suomalainen, T Cogan 2000 Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria Food Res Int 33 281 / Clement JF, Potier S, Kerjean JR, Perrin JC 2007 Sensory characterisation on fine cheese aromas by a qualitative descriptive profile 5th Nizo Dairy Conference, (Papendal) 13/6 poster
- 13) M Normand, N Rolland, R Richoux, JR Kerjean 2006 Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières. Programme nutrition santé en Bretagne 48p C Plé, R Richoux, J Jardin, M Nurdin, V Briard-Bion, S Parayre, S Ferreiras, B Pot, G Bouguen, SM Deutsch, H Falentin, B Foligné, G Jan 2015 Single-strain starter experimental cheese reveals anti-inflammatory effect of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM BIA 129 in TNBS-colitis model. J Functional Foods 18 575 C Plé, J Breton, R Richoux, M Nurdin, SM Deutsch, H Falentin, C Hervé, V Chuat V, R Lemée, E Maguin, G Jan, M Van de Guchte, B Foligné 2015 Combining selected immunomodulatory *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus delbrueckii* strains: Reverse engineering development of an anti-inflammatory cheese Mol Nutrition & Food Res
- 14) JL Bergere, T Sys, L Vassal, M Pitel, M Cathelin 1978 Bactéries lactiques susceptibles d'inhiber la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* en culture et dans le fromage Lait 58 215 D Thuault, E Béliard, J Le Guerin, CM Bourgeois 1991 Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria J Dairy Sc 74 1145 JR Kerjean, JF Chamba, F Prost 1994 Antimicrobial systems. Efficiency of mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria active on *Clostridium tyrobutyricum* against butyric acid fermentation in Emmental cheese Report of the project Flair Agrfoo48 30 p A Mäyrä-Mäkinen, T Suomalainen 1996 Inhibition of clostridia with lactic acid bacteria Brevet européen Valio 10P (souche L. rahmosus LC 405) JR Kerjean, R Ricoux, AF Pypaert, C Cape 2014
- Réduction du taux de sel des fromages et conséquences sur la qualité, étude expérimentale et industrielle en fromages à pâte molle et à pâte pressée dans le cadre du projet TeRiFiQ IAA 131 16
- 15) L Séchaud 1990 Caractérisation de 35 bactériophages de *Lactobacillus helveticus* Thèse Paris 7 sous la direction de JP Accolas B Fayard 1993 Caractérisation de 69 bactériophages de *Streptococcus thermophilus*, incluant 10 bactériophages tempérés Thèse Nancy 1 S Fraud 2015 Constitution d'une collection de bactériophages lactiques Revue ENIL 336 8
- 16) A Thierry, MB Maillard, C Herve, R Richoux, S Lortal 2004 Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese J Food Chem 439 A Thierry, R Richoux, JR Kerjean 2004 Isovaleric acid is mainly produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheese Int Dairy J 14 801 A Thierry, R Richoux, JR Kerjean, S Lortal 2004 A simple screening method for isovaleric acid production by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheese Int Dairy J 14 697
- A Thierry, MB Maillard, R Richoux, JR Kerjean, S Lortal 2005 *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese Lait 85 57 A Thierry, MB Maillard, R Richoux, S Lortal 2006 Ethyl ester formation is enhanced by ethanol addition in mini Swiss cheese with and without added propionibacteria J Agric Food Chem 54 6819 R Richoux, MB Maillard, JR Kerjean, S Lortal, A Thierry 2008 Enhancement of ethyl ester and flavor formation in Swiss cheese by ethanol addition Int Dairy J 18 1140 J Dherbécourt, C Bourlieu, MB Maillard, L Aubert, A Thierry 2010 R Richoux Kinetics and specificity of lipolysis in Swiss cheese J Agric Food Chem 58 11732
- 17) JF Chamba, F Irlinger 2004 Secondary and adjunct cultures in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology 3rd vol 1 ed PF Fox, TM Cogan, T Guinee, P McSweeney Elsevier Applied Science 191-206

DES FERMENTS AU SERVICE DE LA TECHNOLOGIE : PRODUCTION INDUSTRIELLE ET MISE À DISPOSITION

- Cécile CHARLES : Chargée de mission expérimentation ENILV

POUR QU'ON SE COMPRENNE ...

En microbiologie industrielle, le terme de « fermentation » désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes.

Les fermentations industrielles concernent un grand nombre de secteurs: l'alimentaire, la chimie fine, la pharmacie, l'agro-industrie et la cosmétique.

Le bioréacteur (ou fermenteur) est une enceinte permettant d'assurer la croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés.

La biomasse est la « masse totale de l'ensemble des êtres vivants occupant, à un moment donné, un biotope bien défini » (Larousse). Donc, en microbiologie industrielle, la biomasse est la quantité de microorganismes présents dans le bioréacteur.

Métabolite est un « composé organique produit par les micro-organismes au cours de leur métabolisme. On peut les retrouver dans les cellules ou à l'extérieur, dans le milieu de culture. »

QUELLES SONT LES ÉTAPES D'UNE PRODUCTION INDUSTRIELLE DE FERMENTS ?

A l'échelle industrielle, les ferments sont produits sous forme de cocktail de souches ou de souche pure (le moins courant). L'objectif des fabricants de ferments est la production de microorganismes d'intérêts technologiques validés à des concentrations très élevées et avec des durées de conservation longues. La sélection des souches et la mise au point des conditions de production nécessitent un travail très important de recherche, de développement et d'essais pilotes en fromagerie ou salaison.

Les caractéristiques recherchées sont :

- une biomasse importante et stable dans la durée;
- une utilisation facile et adaptée aux pratiques des utilisateurs;
- une conservation des propriétés technologiques initiales des souches;
- un prix abordable.

La production de ferments nécessite de nombreuses étapes et des conditions d'hygiène et de contrôle très strictes, proches de celles que l'on peut retrouver en industries pharmaceutiques (Fig.1). Un maximum d'opérations unitaires est réalisé dans des systèmes clos, stérilisables en place afin d'éviter les contaminations extérieures.

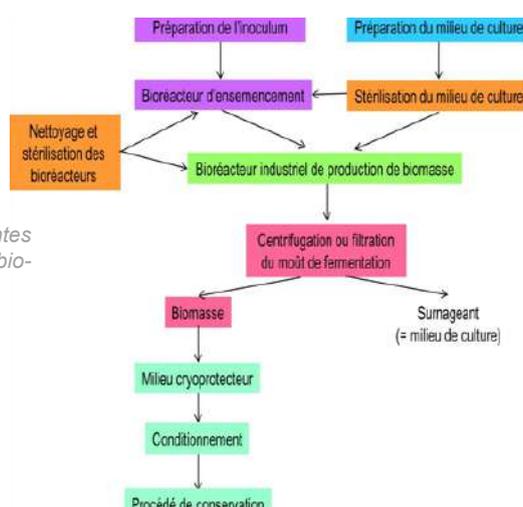


Fig.1 : Schéma simplifié des différentes étapes du procédé de production de biomasse bactérienne

Une fois les conditions de production mises au point en laboratoire pilote vient l'étape dite de « Scale-up » consistant à transférer le procédé d'un bioréacteur de laboratoire de petit volume à celui d'un bioréacteur industriel à grande échelle (Fig. 2).

Les points de vigilance sont les suivants :

- nécessité de passer par des étapes intermédiaires et successives pour augmenter les volumes de culture;
- importance du maintien de conditions physico-chimiques similaires autour des cellules malgré l'augmentation du volume de culture;
- nécessité de réajustement des paramètres de culture.

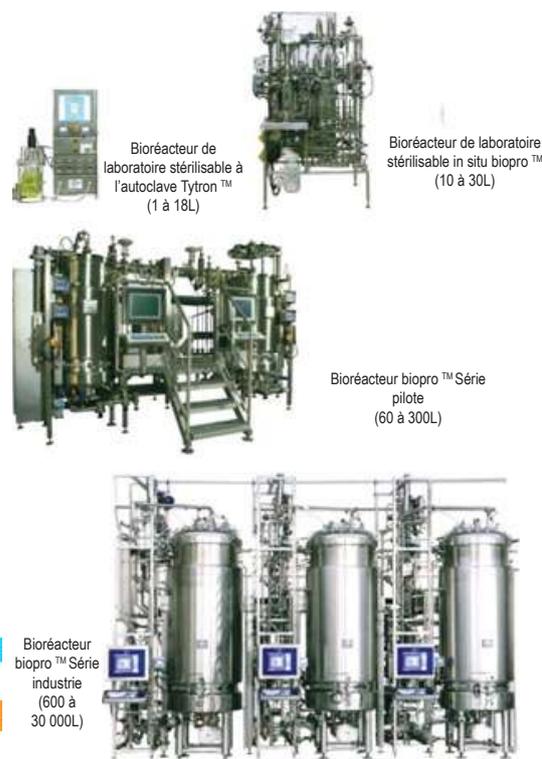


Fig.2 : Les différentes tailles de bioréacteurs
Source : Opérations unitaires en génie biologique – La fermentation (Ed. Bio Tech – CN-DP-CRDP)



Il existe plusieurs procédés de fermentation qui sont utilisés en fonction des objectifs de la fermentation (production de métabolites ou production de biomasse) :

- Le procédé discontinu ou « Batch » : la culture se fait dans un bioréacteur à volume défini et contenant un milieu nutritif non renouvelé. En fin de fermentation, l'ensemble du bioréacteur est soutiré.

- Le procédé semi-continu ou « Fed- Batch » : la culture est discontinuée, sans soutirage, alimentée en continu par du milieu de culture stérile de façon à apporter les éléments nutritifs nécessaires en continu. Le volume du fermenteur varie alors continuellement.

- Le procédé continu : la culture des microorganismes est réalisée en continu, en alimentant de façon ininterrompue

un fermenteur avec un milieu nutritif stérile, tout en soutirant en continu un volume égal du mélange biomasse milieu liquide, de façon à maintenir le volume du réacteur constant. Il permet d'obtenir de fortes concentrations en micro-organismes et est le plus utilisé par les fabricants de ferments.

Ci-dessous sont présentés les avantages et inconvénients des différents procédés de fermentation.

	PROCEDE BATCH	PROCEDE FED-BATCH	CULTURE CONTINUE
Conception	Simple		Complexe
Production	Faible	Importante	Très importante
Durée de la fermentation	Faible	Moyenne	Longue
Fréquence des nettoyages, remplissages, vidanges	Elevée	Faible	Très faible
Taux de contamination	Faible		Elevé
Risque d'apparition de mutants	Faible		Elevé
Consommation de milieu de culture	Faible	Moyenne	Très élevée
Possibilité d'intervention en cas de panne	Facile		Difficile

Fig.3 : Les différents procédés de fermentation : **avantages** et **inconvénients**

Source : Opérations unitaires en génie biologique – La fermentation (Ed. Bio Tech – CNDD-CRDP)

Pour la fabrication de cocktail de souches, elles peuvent être produites de façon individuelle puis assemblées ensuite lors du conditionnement ce qui permet de doser les différentes proportions d'une souche ou d'une autre. Elles peuvent être également produites toutes en même temps dans un seul fermenteur.

Le choix du mode de conservation des souches doit répondre à plusieurs exigences :

- garantir la survie des micro-organismes à long terme;
- garantir leur revivification;
- garantir la conservation des propriétés technologiques de ces microorganismes.

Certains fabricants de ferments proposent aussi des ferments sous la forme liquide.

L'objectif de ces procédés est de diminuer l'activité métabolique des microorganismes en jouant sur la réduction des réactions biochimiques par la diminution de la quantité d'eau libre sous forme liquide (qui sert de solvant et de milieu de diffusion des solutés (substrats et produits)) et/ou la diminution de la température (baisse de l'activité enzymatique).

Ainsi, en fonction des utilisations souhaitées, les fabricants proposent la plupart du temps deux modes de conservation différents :

- La conservation par cryoprotection qui est le procédé le plus courant. Cela consiste à congeler la biomasse avec un cryoprotecteur empêchant que le froid ne tue les cellules.

- La conservation par lyophilisation. Ce procédé consiste à déshydrater, par sublimation, une suspension congelée de micro-organismes. L'eau contenue dans le produit à dessécher est préalablement transformée en glace par congélation puis vaporisée directement sans passage intermédiaire par l'état liquide.

Fig.4 : Les différents modes de conservation : **avantages** et **inconvénients**

		Congélation	Lyophilisation
Pour le fabricant	Coût des installations et de la mise en œuvre	Modeste	Très élevé
	Durée du procédé	Rapide	Long (plusieurs heures)
	Facilité de mise en œuvre	Facile	Complexe car de nombreuses étapes
Pour l'utilisateur	Durée de conservation	Quelques mois à quelques années (dépend de la température)	Années
	Coût d'achat	Economique	Economique
	Facilité d'utilisation	Décongélation	Directement en cuve
	Mise en activité	Rapide	Lente si besoin de la phase de réhydratation
	Taux de survie des bactéries	+++	++
	Modalité de conservation du produit fini	Nécessite un congélateur	Air ambiant

LES FOURNISSEURS DE FERMENTS

Les fromageries peuvent se fournir en ferments auprès de différents types de structures :

- Les industriels fabricants de ferments : ils proposent, via leurs revendeurs, des souches pour différents types de technologies, la plupart du temps sous forme de cocktails de plusieurs souches avec des propriétés technologiques complémentaires. Ceux-ci sont commercialisés sous forme lyophilisée ou congelée, la plupart du temps. Certains fournisseurs, quant à eux, proposent des ferments d'affinage sous forme liquide conditionnés dans une solution hypertonique.

- Les syndicats professionnels des filières sous signe de qualité : certaines filières commercialisent, en direct, pour leurs adhérents, des ferments spécifiques à leur technologie. C'est le cas, par exemple, de la filière comté.

- Un partenariat unique et original entre les filières AOP/IGP des Alpes du Nord (Organismes de Défense et de Gestion (ODG)), un institut technique (ACTALIA La Roche-sur-Foron) et l'Ecole Nationale des Industries du Lait et des Viandes (ENILV) de la Roche-sur-Foron a abouti à la mise en place en octobre 2014 d'une unité de production de ferments lactiques au sein de l'ENILV. L'atelier ferment de l'ENILV fabrique et commercialise les ferments lactiques issus des collections de souches des ODG savoyards. Les souches ont été sélectionnées par Actalia et appartiennent aux filières. La démarche est décrite dans l'article de la Revue des ENIL intitulé « Parce qu'il n'y a pas de fromages sans ferments » numéro 332, Année 2014.



© ENILV

ZOOM SUR... « L'ATELIER DE PRODUCTION DE FERMENTS LACTIQUES DE L'ENILV : UN OUTIL COLLABORATIF AU SERVICE DES FILIÈRES SAVOYARDES SOUS SIGNE DE QUALITÉ. »

Interview de Noémie Sublet, responsable de l'atelier ferment de l'ENILV

En quoi ce projet est-il stratégique pour l'ensemble des partenaires ?

- Il permet de valoriser des souches sauvages issues des collections historiques des filières savoyardes ; des souches particulièrement adaptées aux technologies fromagères mises en place dans les ateliers. L'objectif de leur réimplantation est l'amélioration des qualités organoleptiques des fromages sous signe de qualité. Ces ferments dits « sauvages » se positionnent alors comme une alternative aux ferments industriels actuellement utilisés et à leur manque de diversité.

- Il s'inscrit dans la politique de recherche, de développement et de promotion animée par les acteurs de la filière laitière savoyarde en vue de conforter leurs AOP et IGP (tomme, reblochon, abondance...).

- Il s'inscrit dans les missions de l'ENILV en termes d'animation du territoire, de professionnalisation des étudiants. L'ENILV dispose à présent d'outils de production et d'expérimentation allant de la fabrication des ferments aux fromages finis.

- Le conditionnement, sous forme de souche pure, permet à chaque fromager d'adapter la nature et la quantité d'ensemencement à chaque production.

- L'étroite collaboration entre les ODG, Actalia et l'ENILV, permet une grande réactivité en réalisant des productions à façon pour s'adapter aux besoins de la filière.

Quelles souches proposez-vous actuellement ? Quels sont vos clients ?

L'atelier de production de ferments de l'ENILV propose actuellement des bactéries lactiques acidifiantes sous la forme concentrée congelée. Avec les ODG, nous avons fait le choix de les proposer en culture pure donnant ainsi la possibilité aux transformateurs de les associer de façon indépendante.

A ce jour, nous commercialisons près de 15 souches associables par 2 ou 3 de façon à composer des cocktails mésophiles ou thermophiles selon les usages. Elles sont dédiées à la fabrication de la Tomme de Savoie et pour les levains en Reblochon. Ces souches ont été sélectionnées par Actalia sur des critères technologiques précis vérifiés en laboratoire et sur le terrain ainsi que pour leur résistance aux phages.

La multiplication du nombre de cocktails permet aux opérateurs d'instaurer une rotation dans leurs ateliers.

Les souches sont actuellement vendues aux opérateurs laitiers et fermiers adhérents aux ODG propriétaires des collections. D'importants opérateurs laitiers locaux nous font à présent confiance et utilisent en routine les ferments que nous produisons.

Deux ans après le démarrage de l'activité, pouvez-vous nous dresser un bref bilan ?

A l'ENILV nous sommes fiers d'avoir réussi à mettre en place cette production à grande échelle. Toutes les commandes de développement de souches ont été réalisées avec succès, validées dans les comités techniques des ODG et sont proposées à la vente.

La collaboration entre Actalia, l'ENILV et les filières fonctionne très bien et a fait ses preuves : l'intérêt de la démarche est reconnu et partagé par l'ensemble des acteurs des différentes filières dans la mesure où les ferments répondent aux attentes des fromagers d'un point de vue technologique et gustatif et sont en accord avec les valeurs de leur filière.

Cependant, même si une grande majorité des opérateurs sont convaincus, nous nous apercevons qu'il est difficile pour certains de changer leurs pratiques concernant l'ensemencement. Il nous paraît donc encore nécessaire de travailler à l'accompagnement de la mise en place de ces ferments dans les fromageries, en collaboration avec nos partenaires.

Depuis le démarrage, quelles ont été les évolutions marquantes de l'atelier ?

Parallèlement à la mise en route de l'atelier, l'ENILV a continué à investir dans ce projet en s'équipant de 2 fermenteurs pilotes lui permettant d'une part de mettre au point les conditions de production de nouvelles souches dans l'optique de diversifier la gamme proposée (d'un point de vue technologique et pour proposer des rotations). D'autre part, ce matériel pilote va nous permettre de réaliser des projets de recherche appliquée autour des ferments ce qui s'inscrit dans le développement de l'expertise de l'ENILV autour de l'étude des écosystèmes microbiens laitiers.

Un des avantages pour les opérateurs des filières savoyardes de ce dispositif est la proximité et l'écoute que nous pouvons leur proposer. Aussi, dans un souci d'amélioration continue de cet outil nous sommes attachés à mettre en place des pratiques logistiques et de commercialisation au plus proche des besoins de nos clients qu'ils soient laitiers ou fermiers.

Enfin, parce que nous sommes un établissement de formation mais également pour favoriser l'appropriation de cet outil collectif par les opérateurs de la filière, nous avons organisé, avec nos partenaires ACTALIA et les ODG, deux journées techniques à destination des fromagers pour leur permettre de venir visiter l'atelier, de s'informer, d'échanger et de se former.

Que reste-t-il à mettre en place ?

On est encore dans une phase de développement et d'investissement. Il est impératif pour nous de continuer à promouvoir ces ferments et d'élargir notre carnet d'adresse afin de sécuriser l'atelier à long terme.

Quels sont vos projets d'avenir ?

Nous sommes confiants en l'avenir car cet outil nous offre de nombreuses possibilités de développement.

Dans la continuité du travail qui est réalisé dans les Alpes du Nord, nous aimerions travailler avec d'autres filières AOP/IGP en les accompagnant dans la réalisation de collection de souches qui leur sont spécifiques et à leur valorisation auprès des opérateurs (commercialisation de ces souches). C'est ce que nous avons commencé à faire en étant partenaires du projet de création d'une « souchothèque » pour l'ODG Picodon.

Nous souhaitons également continuer à travailler avec les filières savoyardes pour diversifier notre catalogue de bactéries lactiques et, pourquoi pas, l'ouvrir à d'autres technologies laitières (fromage, beurre, yaourt).

Il nous paraît de plus intéressant de mettre en place des collaborations scientifiques et des partenariats avec d'autres fournisseurs de ferments publics ou privés qui sont dans une démarche équivalente à la nôtre.

Pour finir, l'atelier ferment peut être un support dans nos activités de recherche appliquée autour des écosystèmes microbiens laitiers.

LES NSLAB : GÉNÉRALITÉS ET RESTITUTION DE RÉSULTATS SUR DES EXEMPLES D'UTILISATION EN TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES ALPINES

- Nadège BEL, Olivier SGARD (ACTALIA Produits Laitiers La Roche sur Foron), et Bruno MATHIEU (Syndicat Interprofessionnel du Reblochon).

Les NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) correspondent à l'ensemble des flores secondaires,ensemencées ou non, ne contribuant pas directement à l'acidification dans le processus de fabrication. Parmi ces flores, se retrouvent couramment les lactobacilles mésophiles, mais il faut également compter avec d'autres espèces comme par exemple, les microcoques, les entérocoques, les pédiocoques...

Par le biais de l'apport via la flore du lait, ou par l'ensemencement, ces flores peuvent s'avérer tout à fait intéressantes pour les technologies traditionnelles sous signe de qualité.

Ces flores jouent un rôle important au niveau de l'affinage (formation de la pâte et des arômes). Elles permettent de « signer aromatiquement » un fromage de par la complexité des communautés bactériennes apportées et donc des composés formés.

Il faut surveiller toutefois leur équilibre dans l'utilisation qui en est faite afin d'éviter l'apparition éventuelle de défauts liés éventuellement au sur-développement de l'une ou l'autre des souches présentes.

Panorama de quelques exemples alpins...



LA PROTÉOLYSE DES LAITS EN REPORT POUR LIMITER LE RISQUE D'APPARITION DE LAINURE EN ABONDANCE

Les défauts de lainure sont assez récurrents en technologie Abondance, qu'ils aillent du simple bec, au fil ou à la lainure ouverte, ils déprécient la qualité de pâte des fromages et peuvent poser des problèmes de tenue des fromages à la découpe.

Depuis 2009, ces défauts réapparaissent et touchent plus de 15 % des abondances en moyenne annuelle et plus de 20 % sur certains mois de l'année, laitiers et fermiers confondus. Les différentes pistes connues ne permettant pas d'expliquer l'apparition de ces défauts (fermentations indésirables, défaut d'acidification ou d'égouttage, déminéralisation...), de nouveaux travaux ont été entrepris pour explorer la voie de la protéolyse.

Des résultats très concluants ont été obtenus sur le sujet et après avoir remonté l'ensemble de la chaîne protéolytique, il s'avère que c'est dès le lait de report qu'un manque de protéolyse est constaté pour les fromageries sujettes à ces défauts de type lainure.

Ce manque de protéolyse des laits de report a été attribué en partie à l'appauvrissement des laits en flore naturelle (flore totale et flore à activité protéolytique en particulier). Des travaux ont donc été conduits pour identifier au niveau des laits de la filière, les familles de flores responsables de cette activité protéolytique au niveau des laits durant les 12h de report.

D'autres voies comme l'augmentation de la température de report en tank de la traite du soir ou l'apport de flores protéolytiques du commerce ont également été testées mais n'ont pas apporté soit le résultat escompté soit les garanties suffisantes pour une mise en pratique de routine dans les ateliers. Les travaux d'identification des flores responsables de la protéolyse des laits report en Abondance ont conduit à la sélection d'une douzaine de souche d'entérocoques issue des laits de producteurs.

Celles-ci ont ensuite été testées en laboratoire pour leur innocuité et leurs potentiels technologiques (impact sur la protéolyse précoce des laits, l'acidification...). Les souches les plus intéressantes ont été conservées par les professionnels et techniciens de la filière pour être ensuite testées en atelier pilote puis dans quelques ateliers connus pour leur sensibilité au défaut de lainure. Devant les résultats intéressants en termes de protéolyse des laits, de perméabilité aux gaz des pâtes des fromages obtenus, de gain de texture et bien entendu de réduction du défaut de lainure, une souche est sur le point d'être retenue pour être mise à disposition des ateliers de la filière pour l'ensemencement des laits de tank (voire de cuve).



Photo 1 : Fromage témoin



Photo 2 : Fromage essai avec utilisation de la souche sélectionnée en tank

L'UTILISATION DES LEVAINS NATURELS EN EMMENTAL DE SAVOIE

Les levains naturels sont utilisés depuis des décennies par les fromagers savoyards pour la fabrication de l'emmental de Savoie et perdurent aujourd'hui malgré l'offre de bactéries sélectionnées du commerce. Cette pratique pourrait paraître aujourd'hui désuète, mais les nombreuses tentatives d'abandon par les fromageries se sont toujours accompagnées d'une perte de la richesse aromatique de ce fromage. Les nombreux travaux des équipes d'ACTALIA (celles de J.F. Chamba puis E. Jamet entre autres) ont montré le rôle de cet ensemencement dans la qualité finale des produits et plus récemment, l'équipe en a fait la preuve dans une étude commandée par Savoïcime Filière Emmental de Savoie.

Ces études ont abouti à l'inscription, dans le cahier des charges, de l'utilisation obligatoire des levains naturels dans la fabrication de l'emmental de Savoie. Aujourd'hui, nos connaissances permettent d'affirmer que les levains naturels sont des réservoirs de flore spécifique et que cette flore est particulièrement bien adaptée à la technologie si spécifique de l'emmental de Savoie.

Elle montre le lien entre le terroir et le produit fini, car la diversité microbiologique observée dans ces levains ne résulte pas uniquement des différents ferments commerciaux utilisés dans une fromagerie, mais elle est bien la résultante de la flore naturelle des laits crus et des flores environnementales (atelier, matériel).

Certes, leur poids dans l'ensemencement initial a diminué avec l'utilisation systématique de ferments commerciaux (dont le rôle essentiel est d'assurer l'acidification dans les premières heures de la vie du fromage), mais leur développement au cours du long processus d'affinage leur permet d'exprimer leur potentiel fermentaire et ainsi d'avoir un rôle important dans l'élaboration des qualités sensorielles finales du fromage. Les levains naturels sont, bien entendu, constitués de souches microbiennes provenant du lait et de l'environnement, mais aussi d'un grand nombre de bactéries provenant de l'ensemencement exogène, tout au moins pour les souches les mieux adaptées. Ils sont aussi probablement responsables d'une partie de la régularité des vitesses d'acidification dans le process, car les souches endogènes des levains présentes sont souvent plus résistantes aux attaques phagiques, contrairement aux souches des ferments du commerce.

Aujourd'hui, les fromagers mettent en place des rotations de ferments du commerce pour éviter les risques phagiques, alors que les levains naturels sont utilisés sur plusieurs mois, voire plusieurs années consécutives sans observer de baisse de leur activité acidifiante.

Il est important de noter que lorsqu'un atelier de transformation utilise les levains naturels d'une autre fromagerie, par exemple suite à un accident ou lors d'un redémarrage d'atelier.

La composition microbienne du levain utilisé se modifie très rapidement au cours de son utilisation par la fromagerie (repiquages successifs) pour retrouver une composition similaire à celle observée avant l'accident. L'apport de ces sérums acidifiés (levain après incubation), riches en protéines sériques, contribue à enrichir le lait en facteurs de croissance pour les autres bactéries naturellement présentes ou apportées.

L'effet de cet enrichissement est sans doute encore plus notable lorsque le fromager n'utilise que des ferments en ensemencement direct (congelé ou lyophilisé). Cette question n'a jamais fait l'objet de travaux de démonstration et mériterait sans doute une étude pour étayer cette hypothèse.

Enfin, et c'est là tout l'intérêt par rapport à la thématique des NSLAB, ces levains naturels peuvent, au-delà des streptocoques et des lactocoques, contenir en faible quantité des lactobacilles hétérofermentaires du groupe 2 (*L. paracasei*, *L. plantarum*...), des lactobacilles hétérofermentaires du groupe 3 (*L. buchneri*...) ou des entérocoques. L'emploi des levains naturels en fabrication d'Emmental de Savoie donne alors la signature aromatique de la fromagerie.

En effet, chaque fromagerie disposant d'un lait de provenance différente, d'un environnement d'atelier particulier et de souches du commerce spécifiques, cet ensemble formate un écosystème microbien propre à chaque atelier qui au cours du processus de transformation et de l'affinage donnera des caractéristiques propres à la production.



Photo 3 : Récupération du sérum au soutirage pour la fabrication des levains naturels du lendemain

ESSAIS DE FLORES DE PIGMENTATION ISSUES DE LA COLLECTION DE LA FILIÈRE REBLOCHON

Mise en collection de la flore d'intérêt technologique issue de la filière Reblochon

Le Syndicat Interprofessionnel du Reblochon (SIR) a commencé à travailler sur la mise en collection des souches d'intérêt technologique issues de son terroir, au tout début des années 1990.

Le travail portait essentiellement sur les souches lactiques mais les flores d'affinage identifiées lors du travail de sélection ont été également mises en collection. Un travail spécifique sur les flores d'affinage de pigmentation a été initié par AERIAL en collaboration avec les filières reblochon, munster, epoisses et livarot.

Le but de ce travail était de sélectionner des souches issues des écosystèmes naturels des filières fromagères capables de produire des pigments en substitution des colorants de pâtes de type carotène. Il avait été constaté lors de l'étude préalable, que les fromages à croûte lavée présentaient une population en *Brevibacterium linens* plus importante et plus variée que le Reblochon qui ne subit qu'un seul lavage en sortie de séchoir et présente une croûte fleurie liée à l'installation de *Geotrichum*.

De ce fait les travaux du SIR ont dû se poursuivre pendant plusieurs années afin d'isoler, de caractériser et de tester de nouvelles souches.

La production pigmentaire, un phénomène complexe à maîtriser

Lors de ces travaux il est apparu que la production pigmentaire par les souches relève de phénomènes complexes et quelquefois difficiles à maîtriser :

- les capacités métaboliques de la souche à produire les pigments;
- les conditions de température, hygrométrie, de renouvellement d'air des locaux d'affinage;
- des interférences avec les autres souches naturelles ou apportées sur le croutage.

Il a donc été nécessaire de sélectionner des souches suffisamment rustiques pour répondre favorablement aux différences de pH, de taux de sel, d'extrait sec du fromage lors de son affinage, mais aussi des différentes conditions d'affinage liées aux locaux. Des essais sur caillé modèle selon 12 conditions de tests ont été effectués au laboratoire d'ACTALIA afin de faire une première sélection. Il a été constaté une production de pigment dans la mesure où les souches pigmentaires n'étaient pas en concurrence (probablement nutritionnelle) avec une population trop importante de *Geotrichum* ou de levure également présentes sur le croutage des reblochons.

Les essais en fromagerie

Des essais ont été effectués en fabrication laitière à l'ENILV de La Roche-sur-Foron et en fabrication fermière en testant différentes conditions d'ensemencement : dans le lait, en pulvérisation en sortie de saumure et/ou en pulvérisation après le lavage des fromages en sortie de séchoir. Le résultat des derniers essais effectués en cocktail de 5 souches (*Staphylococcus* à coagulase négative, *Brevibacterium linens* et *Mycetocola*) s'est avéré concluant en fromagerie fermière



Photo 4 : Fromage témoin



Photo 5 : Fromage essai avec cocktail de 5 souches pigmentaires

Bien entendu, les reblochons ont été soumis à un examen organoleptique afin d'évaluer un éventuel impact sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Les fromages essais ont eu tendance à présenter des caractéristiques à connotation animale. Des essais sont toujours en cours et portent sur les souches pures issues du cocktail testé, afin de déterminer le ou les microorganismes responsables de la formation de la pigmentation d'une part et/ou de la formation de ces goûts animaux d'autre part.

GESTION DU RISQUE PHAGIQUE EN ATELIER FROMAGER

Pierre SECHET : Enseignant en génie alimentaire - ENILIA
 Sarah CHUZEVILLE : Chef de projets microbiologie - ENILIA

LES BACTÉRIOPHAGES : QU'EST-CE QUE C'EST ?

Il a été décrit que les phages représentent l'entité biologique la plus abondante sur Terre en atteignant une population de 10^{31} individus (Breitbart and Rohwer, 2005). Par définition, les bactériophages sont des virus capables d'infecter les cellules bactériennes. Ces virus bactériens ont été co-découverts par Frédéric William Twort et Félix Hubert d'Hérelle, à qui l'on doit le nom de bactériophages qui signifie étymologiquement «mangeurs de bactéries», en 1915 et 1917 respectivement. Une infection par un bactériophage conduit ainsi le plus souvent à la mort de la bactérie infectée.

Toutes les espèces bactériennes sont susceptibles d'être attaquées par des bactériophages, que ce soient des bactéries dites utiles (ex. bactéries lactiques) ou des bactéries pathogènes (s'attaquant aux Hommes ou animaux). Comme tous les virus, les bactériophages possèdent une organisation biologique rudimentaire et dépendent des fonctions de l'hôte (ici bactéries) pour se multiplier et survivre à long terme. Les bactériophages sont donc des parasites obligatoires des bactéries puisqu'ils ne possèdent pas de métabolisme intrinsèque en leur absence (Calendar, 2006).

Dans la plupart des cas, les bactériophages sont composés uniquement de protéines et d'acides nucléiques. La majorité fait partie du groupe taxonomique des *Siphoviridae* et, leur morphologie consiste alors en une tête qui contient (protège) une molécule d'ADN viral qui est connectée à une queue via un collier (Figure 1) (Mc Grath et al., 2007).

La queue, comprenant des fibres caudales et une plaque basale, représente la structure protéique qui permet la reconnaissance et l'adhésion des bactériophages à la cellule bactérienne (Mc Grath et al., 2007).

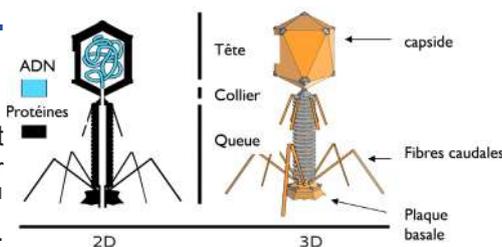


Fig 1. Représentation schématique d'un bactériophage

BACTÉRIOPHAGES ET LEURS HÔTES BACTÉRIENS : QUELLES INTERACTIONS ?

L'adhésion entre un bactériophage et une cellule bactérienne se fait entre des récepteurs (protéines) qui sont spécifiques l'un avec l'autre. La présence de récepteurs à la surface de cette dernière détermine les possibilités d'association entre phage et bactérie. Il existe une grande diversité de récepteurs à la surface des bactéries. Toutes les souches d'une espèce donnée (ex. *Lactococcus lactis*) ne possèdent alors pas les mêmes récepteurs ce qui explique, en partie, le fait qu'un phage donné n'est pas capable d'infecter toutes les souches bactériennes d'une espèce donnée (Mahony et al., 2016). Une fois le phage adhérent à une cellule bactérienne, le bactériophage injecte son ADN dans le cytoplasme de la cellule bactérienne. Les bactériophages peuvent alors être différenciés en deux groupes sur la base de leur cycle de vie. Un bactériophage dit «tempéré» est capable d'intégrer son ADN dans le génome de la bactérie infectée. On parle alors de prophage et de souche bactérienne lysogène. Le métabolisme bactérien ne va, généralement, pas être altéré quand un phage est intégré dans son génome (Mc Grath et al., 2007). Le phage se multiplie en même temps que la cellule bactérienne se multiplie. Une copie du génome d'un phage se retrouvera alors dans toutes les cellules bactériennes filles, issues de la multiplication bactérienne (Calendar, 2006).

Le prophage en phase de latence peut, en réponse à un stimulus environnemental comme un stress (ex. changement de température, de pH, etc.), être induit et un cycle lytique peut se mettre en place.

Lorsqu'un phage tempéré entre en cycle lytique ou lorsqu'un bactériophage lytique obligatoire (n'est pas capable de s'intégrer dans le génome de la bactérie, dit «virulent») entre dans une cellule bactérienne, le phage s'empare de la machinerie métabolique de la bactérie afin de pouvoir se multiplier (production de nouvelles particules de phages).

Ce processus peut prendre quelques minutes et résulter dans la lyse de la cellule bactérienne (Mc Grath et al., 2007). L'éclatement de la bactérie conduit à la libération dans l'environnement d'un nombre important de bactériophages (jusqu'à plusieurs centaines) qui peuvent se propager à nouveau dans de nouvelles bactéries (Calendar, 2006; Mc Grath et al., 2007).

PRÉVALENCE DANS L'ENVIRONNEMENT ET IMPACTS ÉCONOMIQUES : CAS PARTICULIER DES ATELIERS FROMAGERS

Les bactériophages peuvent se trouver n'importe où des bactéries existent que ce soit dans les océans, les déserts, en Antarctique, les sources chaudes, l'intestin humain, les laiteries, etc. (Mc Grath et al., 2007).

Ces agents bactéricides, étant susceptibles d'attaquer des bactéries infectant l'Homme ou les animaux (comme par ex. *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*), sont de plus en plus envisagés comme une alternative à l'utilisation des antibiotiques en santé humaine, l'apparition de multi-résistances aux antibiotiques posant de très sérieux problèmes dans les traitements thérapeutiques des infections dues aux bactéries.

D'un autre côté, les bactériophages peuvent avoir un impact négatif sur les activités humaines.

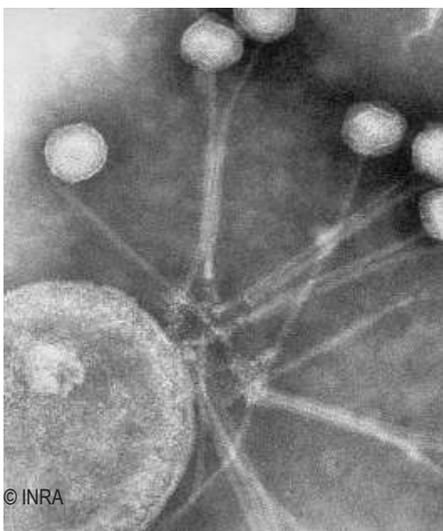
Dans l'industrie laitière, les principales sources (entrées) de bactériophages dans les ateliers de transformation du lait sont les matières premières (le lait) et l'introduction de bactéries lactiques lysogènes (Mahony et al., 2016; Mc Grath et al., 2007).

La dispersion des bactériophages peut être rapide au sein de l'outil de production au travers des liquides utilisés (eau de rinçage) et/ou produits (lactosérum).

Ces deux éléments doivent alors être pris en compte dans le suivi du risque d'attaque phagique. Des phages ont été largement isolés de lait cru et il a été proposé que leur présence était liée à une contamination du lait en certaines bactéries lactiques sauvages propagatrices des phages (Madera et al., 2004).

Par ailleurs, il est communément accepté que les bactéries lactiques utilisées comme ferments portent parfois des prophages intégrés dans leur génome qui, sous certaines conditions, sont susceptibles d'entrer en cycle lytique voir d'infecter d'autres souches appartenant à la même espèce bactérienne.

On estime que de 0,5 % à 10 % des fermentations utilisant des bactéries lactiques sont affectées générant un grand nombre de défauts de saveur, texture, aspects des produits et des larges pertes économiques. Les attaques phagiques étant sensiblement rapides, l'apparition de problèmes technologiques dus à des attaques phagiques peut être très rapide.



Whitehead et Cox ont été les premiers scientifiques en 1935 à décrire les effets préjudiciables des attaques phagiques dans l'industrie laitière et, malgré, de larges avancées technologiques et scientifiques, la plus grande cause d'échec de fermentation reste liée aux attaques phagiques des bactéries lactiques utilisées.

Pour les cas les plus sévères, une infection par des phages peut entraîner une perte totale de l'activité des ferments d'acidification, des défauts de texturation (notamment des phages infectant *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus*) et des défauts organoleptiques (notamment des phages infectant *Leuconostoc mesenteroides*). L'apparition de défauts sensoriels liés à des attaques phagiques seront détectables plus tardivement.

MÉTHODES DE DÉTECTION ET D'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ DES BACTÉRIOPHAGES POUR UNE MEILLEURE GESTION DU RISQUE PHAGIQUE

Différents outils analytiques ont été développés afin de répondre à la problématique des attaques phagiques dans l'industrie laitière (Figure 2).

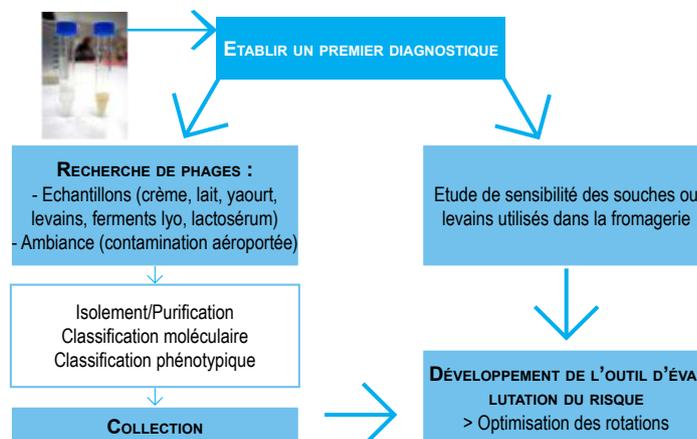


Fig 2. Schéma représentant une procédure analytique pour la gestion du risque phagique en atelier de transformation laitière

Ces outils sont soit microbiologiques soit utilisent des techniques de biologie moléculaire mais tous permettent la détection des bactériophages dans des échantillons laitiers (lait, crème, yaourt, lactosérum, levains, ferments, etc.) ou dans l'environnement (contamination aéroportée).

Premièrement, il est possible de réaliser une quantification de la contamination phagique dans des échantillons par la réalisation d'une titration d'unités formant des plaques de lyse en utilisant la technique de dénombrement dit de la double couche. Une suspension de la souche à infecter et une suspension de l'échantillon à titrer sont mises en contact pendant la durée nécessaire à l'adsorption des phages sur les bactéries réceptrices. Le mélange est alors additionné d'un milieu de culture à faible teneur en agent solidifiant et en surfusion qui est coulé sur une boîte de milieu de culture gélosé. Les plaques de lyse sont dénombrées après incubation (Figure 3). L'inconvénient de cette technique est la création d'un biais par le choix d'une ou plusieurs souches bactériennes uniquement à mettre en contact avec le phage. Tous les phages présents dans l'échantillon ne seront alors pas forcément dénombrés.



Fig 3. Plaques de lyse observables sur un tapis bactérien sur boîte de Pétri.

Par ailleurs, il est aussi possible de réaliser la détection de phages par des méthodes impliquant la biologie moléculaire (Figure 4). Dans ce cas, quelques microlitres de l'échantillon est mélangé à un mix réactionnel qui va permettre d'amplifier une région particulière et spécifique du génome d'un type de bactériophage spécifiquement recherché (Figure 4A). Cette amplification est appelée réaction PCR (pour Polymerase Chain Reaction). Des PCR dites multiplex sont également disponibles, qui permettent de détecter simultanément la présence de phages attaquant différentes espèces bactériennes d'intérêt laitier (Figure 4B). (Binetti et al., 2008 ; Labrie and Moineau,

2000 ; Ly-Chatain et al., 2011; Martín et al., 2008 ; del Rio et al., 2007, 2008 ; Zago et al., 2008). L'utilisation de standards dans la mise en œuvre des PCR permet de déterminer de manière semi-quantitative la concentration en phages d'un échantillon donné. Ces méthodes de détection sont actuellement disponibles pour l'ensemble des grands groupes de phages attaquant les souches des espèces de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus* et permettent de détecter les bactériophages à un seuil compatible avec un niveau de déclenchement d'un accident phagique (10^3 unités formant des plaques / ml).

Un projet collaboratif en cours, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et co-financé par le CNIEL (projet LYSOPLUS, 2014-2018), a pour objectif de développer de tels outils pour la détection des bactériophages des souches bactériennes appartenant au genre *Leuconostoc*. Il vise également à approfondir les connaissances générales sur l'impact des bactériophages de *Leuconostoc* utilisés dans l'industrie laitière (mais aussi, plus largement, dans les industries de panification et du vin) et compléter les collections de phages existantes.

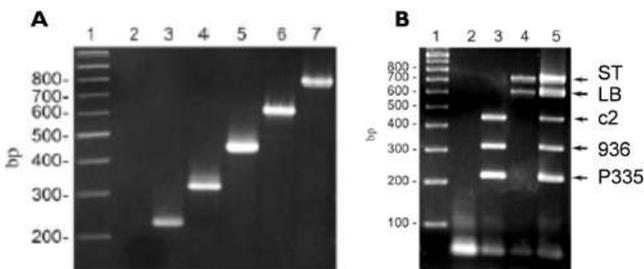


Fig 4. Détection de bactériophages dans des échantillons. (A) PCR individuelle de détection de bactériophages : 1, marqueur de taille ; 2, absence de bactériophages ; 3, présence d'un phage de *Lactococcus lactis* appartenant au groupe P335 ; 4, présence d'un phage de *Lactococcus lactis* appartenant au groupe 936 ; 5, présence d'un phage de *Lactococcus lactis* appartenant au groupe c2 ; 6, présence d'un phage de *Lactobacillus bulgaricus* ; 7, présence d'un phage de *Streptococcus thermophilus*. (B) PCR multiplex de détection de bactériophages : 1, marqueur de taille ; 2, absence de bactériophages ; 3, présence de phages c2, 936 et P335 ; 4, présence de phages de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* ; 5, présence de phages C2, 936, P335, de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Des méthodes de biologie moléculaire ont également été développées afin d'étudier la diversité des bactériophages. La diversité des bactériophages de *Streptococcus thermophilus* peut être étudiée en comparant les séquences d'une région spécifique de son génome (région VR2)(Binetti et al., 2005 ; Duplessis and Moineau, 2001). Cette région étant variable, le pourcentage de similarité de bactériophages peut être calculé et un arbre phylogénétique peut être établi.

Une telle région n'est pas encore clairement établie pour les bactériophages attaquant les autres bactéries lactiques. Une méthode générale est alors utilisée qui, même si elle apporte un biais plus important que le séquençage, est très utile pour l'étude de la diversité des bactériophages (Figure 5, méthode RFLP pour restriction Fragment Length Polymorphism) (Barrangou et al., 2002).

De telles études de diversité permettent de mieux comprendre l'évolution des bactériophages au sein de l'environnement laitier. De telles connaissances peuvent permettre de détecter l'origine d'une contamination phagique en cas d'accident de fabrication (ex. contamination du lait, du personnel) afin de trouver des solutions adéquates, efficaces et rapides d'élimination de la source de contamination.

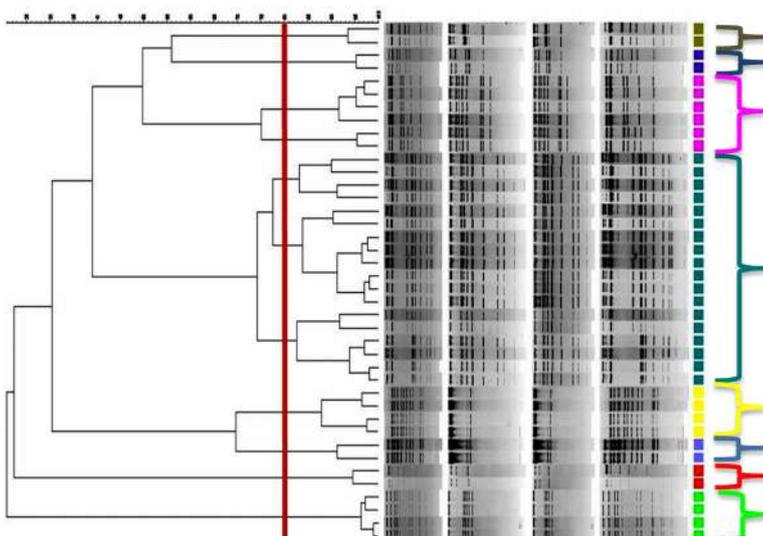
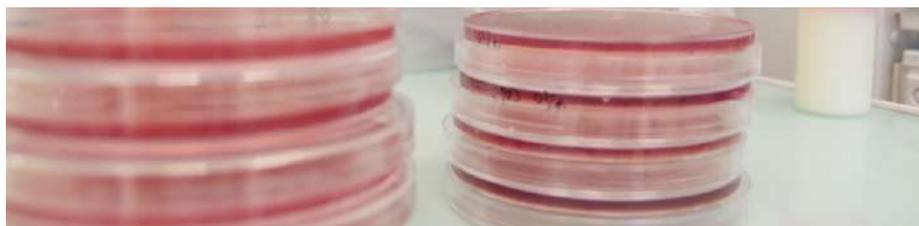


Fig 5. Exemple d'un dendrogramme suite à une étude de diversité de bactériophages.

Même si les techniques de biologie moléculaire permettent de détecter la présence de bactériophages avec un biais largement plus réduit que les techniques de titration microbiologique, celles-ci ne permettent pas l'isolement et la purification des bactériophages contenus dans les échantillons. Notamment, de nombreuses collections de phages se sont créées, à l'instar de la collection de phages de la collection CIMIL du Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL, programme PhageCollect réalisé par ACTALIA Produits Laitiers), afin d'étudier la sensibilité/résistance de souches bactériennes d'intérêt laitier à des phages virulents (i.e. lysotypage de souches) et trouvés comme circulant récemment dans les ateliers de transformation laitière. Cette collection est constituée de 92 phages de *Streptococcus thermophilus* et 64 phages de *Lactococcus lactis*. La force d'une telle collection réside en la possibilité d'optimiser les compositions des ensemencements et les rotations mises en place dans les ateliers. L'accès à cette collection est ouvert aussi bien aux professionnels de l'industrie qu'aux institutions publiques dans le cadre de projets de Recherche et de R&D (www.francemil.fr, collection conservée sous certification ISO9001 pour le CNIEL par ACTALIA Produits Laitiers 74).

PRINCIPES DE PRÉCAUTION POUR LIMITER LA PROPAGATION PHAGIQUE

Il ne sert à rien de sélectionner ou d'améliorer génétiquement les souches de bactéries lactiques sur leurs propriétés biochimiques et technologiques, si le problème des bactériophages n'est pas surveillé en permanence et réglé dans les ateliers, car toutes les souches sélectionnées introduites sans précaution sont susceptibles d'être éliminées très rapidement par des bactériophages.



Voici des points à aborder afin de limiter voir dans certaines situations éliminer la propagation des phages.

1-La production d'un ferment indemne de phages :

La première barrière de protection d'un ferment lactique doit se situer dès la salle de préparation des ferments. La production des ferments doit être réalisée dans une pièce aussi éloignée que possible des locaux de fabrication.

L'aménagement de cette pièce devrait systématiquement comporter un système de surpression d'air filtré prélevé à l'extérieur de l'usine, là où la contamination en phage est faible.

On devrait compléter l'équipement par des lampes à ultra-violet germicides allumées en permanence quand il n'y a pas de personnel. L'accès à ce local doit être réglementé et limité au personnel de préparation des levains.

La seconde barrière de protection doit être la cuve à ferment. Dans la plupart des cas, les cuves à ferment ne sont pas hermétiquement closes, et se trouvent donc soumises quotidiennement à un risque élevé de contamination phagique, par le flux d'air lors des ouvertures de couvercle.

Pour se prémunir de ce risque, il existe des cuves à ferment protégées, de deux types : les cuves à ferment totalement hermétiques, et les cuves à ferment non hermétiques, mais protégées par des filtres.

Par ailleurs, des milieux de culture anti-phages pour la multiplication des ferments sont aussi diffusés dans le commerce (PIM = phage inhibitory media). Leur principe repose sur le fait qu'il a été observé que le développement d'un certain nombre de phages de *Lactocoques* était inhibé lorsque des bactéries sensibles étaient cultivées dans du lait qui avait été chauffé après addition d'un mélange de différents phosphates, de façon à chélater les ions divalents tels que les ions calcium.

Dans ces conditions, l'adsorption de très nombreux phages aux bactéries est altérée et leur multiplication végétative ne peut alors pas s'accomplir. Des variantes de ces milieux existent. On peut cultiver les Lactocoques à pH constant, vers pH 6 ou 6,3 (external pH control) sur un milieu à base de lactosérum, en diminuant les quantités de phosphate. D'autres milieux existent avec de fortes concentrations en phosphates insolubles ou en citrates (internal pH control) qui se solubilisent au fur et à mesure du développement du ferment. Enfin, si on utilise simplement un milieu à base de poudre de lait écrémé, un traitement thermique de 90 °C à 95 °C pendant 30 minutes est nécessaire afin d'éliminer les phages.

2-L'utilisation de cultures bactériennes mixtes,

composées de ferments dont la composition est « globalement » connue mais composée d'une multitude de bactéries génétiquement différentes permet d'éviter l'accident d'acidification.

Ces ferments mixtes peuvent contenir des bactériophages, sans que leur comportement technologique soit perturbé. Il y a une sorte d'équilibre naturel entre les flores résistantes et les bactériophages présents. Ces ferments peuvent être attaqués par des phages étrangers, mais ils surmontent rapidement cette attaque.

En effet, même si une grande partie de la population est éliminée par des phages virulents, cette flore va être rapidement remplacée par une autre flore, jusque-là sous-dominante qui est naturellement résistante à ces phages. De tels mécanismes de résilience de la population globale expliquent pourquoi l'activité acidifiante des ferments mixtes, ne subit pas de chutes irrémédiables d'activité, mais qu'elle peut, par contre, donner lieu à des fluctuations d'activité acidifiante dommageables pour les fabrications.

Mais attention, il peut y avoir aussi l'installation de plusieurs phages différents (ex. possédant des récepteurs différents), qui peuvent rendre le ferment complexe partiellement ou totalement inopérant.

Une partie de la population composant le ferment mixte peut aussi être phagée. Ceci va éventuellement altérer le produit laitier, sans que le fromager s'en rende compte directement.

A titre d'exemple concret, différentes souches de *Lactococcus lactis diacetylactis* peuvent être utilisées en mélange pour la maturation des crèmes de beurrerie, soit pour leur capacité à acidifier soit pour leurs propriétés aromatiques. Si une partie des souches a été phagée, la cinétique d'acidification peut être tout à fait normale, mais progressivement les crèmes seront de moins en moins aromatiques. Au final, le beurre sera « plat », ne correspondant alors plus aux critères aromatiques désirés, alors que la maturation des crèmes semblait être satisfaisante.

L'utilisation de ferments complexes a aussi la particularité de donner lieu à des fluctuations d'activités acidifiantes, empêchant la reproductibilité des cinétiques d'acidification.

3- L'utilisation de souches sélectionnées pures ou de mélanges de souches bien définies de bactéries lactiques, pour maîtriser aussi parfaitement que possible les fabrications de produits laitiers fermentés, est une idée séduisante, mais qui nécessite des applications, des utilisations spécifiques.

Le système repose sur l'emploi en rotation de différents ferments, chacun d'eux étant constitué par un mélange de plusieurs souches. Toutes les souches doivent posséder un lysotype différent. Comme elles sont utilisées en mélange, elles doivent être évidemment compatibles entre elles, sans qu'une inhibition des unes par les autres ne se produise (notamment par la production de bactériocines par certaines souches du cocktail).

Les rotations de souches doivent être périodiques, ou un dépistage régulier de la présence de phages doit être effectué (ex. dans les sérums). Si des phages sont mis en évidence dans l'usine, il est fortement conseillé de procéder à une rotation de ferments. Néanmoins, il n'existe pas de « règle » définie sur la périodicité de rotation des souches.

Il n'y a pas de corrélation d'une laiterie à une autre. Soit les rotations peuvent être longues, jusqu'à l'apparition des débuts des problèmes d'acidification, avec la possibilité de « perdre » la souche. Soit les rotations peuvent être courtes, évitant ainsi l'installation de phages entre deux rotations, mais avec le risque de ne pas suffisamment diluer les phages entre deux rotations et de voir à un moment donné toutes les souches inactives.

Les armes anti-phages issues de la biologie moléculaire sont actuellement à l'étude. Des systèmes de défense naturelle contre l'infection virale ont été identifiés chez des bactéries lactiques (ex. *Lactococcus lactis*).

Ces systèmes de défense peuvent être, grâce à l'ingénierie génétique, optimisés, combinés, et introduits dans les souches bactériennes utilisées dans ces bioprocédés. Ces supports génétiques construits, en utilisant les informations provenant de l'étude des génomes et la technologie de l'ADN recombinant, prennent la forme de phages ou de plasmides modifiés qui ciblent différentes étapes du cycle lytique.

Il est important de souligner que, pour le moment, ces systèmes ne sont pas utilisés dans des productions destinées à la consommation humaine à la faveur de restrictions légales et des opinions publiques concernant l'introduction d'ADN recombinant dans la chaîne alimentaire.

Actuellement, un système est utilisé et testé : CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Ce système peut être acquis par les bactéries suite à une première infection conférant à la cellule une « immunité ».

Il protégera alors spécifiquement la cellule contre les matériels génétiques étrangers entrants (ex. virus et plasmides) si celle-ci est à nouveau infectée par le même type de phages.

Cette technique n'est pas encore applicable aux Lactocoques qui ne possèdent pas de région CRISPR connue d'intérêt, elle devrait en revanche pouvoir faire évoluer l'utilisation de certaines souches de *Streptococcus thermophilus*.

Cette technologie aboutit à des ferments non considérés comme génétiquement modifiés et présente un avantage de taille : elle permet d'augmenter la résistance des bactéries aux phages tout en conservant leurs fonctionnalités acidifiante, texturante et/ou aromatisante.



4- Les points de contrôle afin de lutter contre la dissémination des phages sont nombreux.

- L'atmosphère : les virus sont des particules de très petite taille, qui contrairement aux bactéries sont extrêmement volatiles. Les flux d'air doivent être maîtrisés. Les salles sensibles doivent être filtrées, maintenues en surpression. L'air doit être désinfecté car en éliminant les bactéries de l'air, des surfaces, la reproduction et la dissémination des phages est interrompue.
- Le matériel : la taille réduite des phages, leur résistance aux produits chimiques les rend particulièrement virulents. Il faut supprimer les souillures organiques inhérentes au matériel qui permettent le développement microbien et donc la prolifération phagique (Figure 6).

Le matériel doit être désinfecté soigneusement avant tout contact avec le lait et les ferments, les supports doivent présenter un minimum d'aspérité ou de porosité. Il ne faut pas laisser d'ingrédients, qui seront introduits ultérieurement dans le lait à l'air libre, comme la présure, le CaCl_2 , le sel, les sachets de ferments (qui seront désinfectés avant ouverture)...

- Les locaux : lutter contre les phages, c'est éliminer les multiplications microbiennes non contrôlées ! Il ne faut pas trouver de lait, de coproduits, de matières premières fermentées en dehors des circuits définis (Figure 6). La circulation stricte du personnel respecte la marche en avant dans les salles sensibles où se réalisent les fermentations. Les locaux où s'effectuent les fermentations (ensemencement, maturation...) doivent être dans un état sanitaire irréprochable. Il ne faut pas oublier de désinfecter régulièrement l'environnement de stockage des ferments lactiques (frigo, congélateurs...).

Ne pas faire tremper dans les mêmes bacs de désinfectant du matériel ayant été en contact avec de la matière fermentée et le reste du matériel.

- Le nettoyage : Les produits utilisés pour le nettoyage doivent être couplés à de bons désinfectants. Les produits virucides, tels que les peroxyacides sont relativement efficaces, mais parfois pas suffisants. L'hypochlorite de sodium à une concentration de 0,2 % semble le virucide le plus puissant. Son utilisation doit être stricte afin de ne pas détériorer irréversiblement le matériel quel que soit sa composition.

- Les auxiliaires technologiques : ils peuvent être des sources de phages selon leur provenance, comme la poudre de lait, les lactoreplaceurs, les sérums, les réténas, perméas, voir même les ferments.

LUTTER CONTRE LES PHAGES, C'EST ELIMINER LES MULTIPLICATIONS MICROBIENNES NON CONTRÔLÉES (Figure 6) !



Fig 6. Exemples de situations pouvant amener à une élévation très importante du taux phagique en atelier de production : A : lait sur le sol ; B : bouche d'égoût ; C : fuite de lait fermenté sur le sol ; D : lait sur le sol ; E : produits fermentés en dehors des circuits ; F : produits fermentés dans les éviers

RÉFÉRENCES

- Barrangou, R., Yoon, S.-S., Breidt Jr, F., Fleming, H.P., and Klaenhammer, T.R. (2002). Characterization of six *Leuconostoc fallax* bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5452–5458.
- Binetti, A.G., Del Río, B., Martín, M.C., and Alvarez, M.A. (2005). Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6096–6103.
- Binetti, A.G., Capra, M.L., Alvarez, M.A., and Reinheimer, J.A. (2008). PCR method for detection and identification of *Lactobacillus casei/paracasei* bacteriophages in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 147–153.
- Breitbart, M., and Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus ? *Trends Microbiol.* 13, 278–284.
- Calendar, R. (2006). *The Bacteriophages* (Oxford University Press, USA).
- Duplessis, M., and Moineau, S. (2001). Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 41, 325–336.
- Labrie, S., and Moineau, S. (2000). Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 987–994.
- Ly-Chatain, M.H., Durand, L., Rigobello, V., Vera, A., and Demarigny, Y. (2011). Direct Quantitative Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages from Milk and Whey by Real-Time PCR: Application for the Detection of Lactococcal Bacteriophages in Goat's Raw Milk Whey in France. *Int. J. Microbiol.* 2011, 594369.
- Madera, C., Monjardín, C., and Suárez, J.E. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7365–7371.
- Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E., and van Sinderen, D. (2016). Phage-Host Interactions of Cheese-Making Lactic Acid Bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 267–285.
- Martín, M.C., del Río, B., Martínez, N., Magadán, A.H., and Alvarez, M.A. (2008). Fast real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages in milk. *Food Microbiol.* 25, 978–982.
- Mc Grath, S., Fitzgerald, G.F., and van Sinderen, D. (2007). Bacteriophages in dairy products: pros and cons. *Biotechnol. J.* 2, 450–455.
- del Río, B., Binetti, A.G., Martín, M.C., Fernández, M., Magadán, A.H., and Alvarez, M.A. (2007). Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol.* 24, 75–81.
- del Río, B., Martín, M.C., Martínez, N., Magadán, A.H., and Alvarez, M.A. (2008). Multiplex fast real-time PCR for quantitative detection and identification of cos- and pac-type *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4779–4781.
- Zago, M., Rossetti, L., Reinheimer, J., Carminati, D., and Giraffa, G. (2008). Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR. *J. Dairy Res.* 75, 196–201.
- Revue des ENIL 231.
- Revue des ENIL 315.
- Revue des ENIL 342.
- RLF 698 .
- Expérience de terrain.

STAGES ANFOPEIL

-T.MICHELET, Coordinateur-Responsable pédagogique, ANFOPEIL

Les ferments lactiques sont une pierre angulaire de la transformation laitière.

Une bonne connaissance des propriétés des bactéries lactiques, de leurs rôles dans les différents produits, de leurs conditions de développement tout au long des procédés de fabrication permettra de maîtriser les points clefs et assurera une mise en oeuvre réussie. Il va de soi que l'on ne peut pas parler de ces précieux auxiliaires technologiques sans aborder les prédateurs que sont les bactériophages lactiques.

Comme dans tout domaine technique et scientifique, les connaissances avancent, les techniques évoluent et il convient d'entretenir ses compétences. L'ANFOPEIL propose tous les ans des stages sur les technologies laitières et fromagères où le sujet des ferments lactiques est systématiquement traité.

D'autres stages plus spécifiques ont pour objet d'approfondir cette thématique. C'est le cas pour 2017 de 3 stages proposés par l'ENILV et l'antenne ACTALIA de la Roche-sur-Foron.



<p>Stage 4 «Ferments et enzymes en fromagerie»</p>	<p>ENILV La Roche-sur-Foron Octobre 2017 3 Jours Niveau Perfectionnement</p>	<p>Objectifs : Comprendre la taxonomie des bactéries lactiques et leurs conditions de développement Identifier les points clefs de la préparation des ferments Identifier le rôle et incidence des ferments lactiques, les systèmes d'ensemencement dans un process fromager Apprécier les caractéristiques d'un coagulant</p>
<p>Stage 44 «Détection, titration, conservation et mise en collection des bactériophages lactiques»</p>	<p>ACTALIA La Roche-sur-Foron Juin 2017 2 Jours Niveau Expert</p>	<p>Objectifs : Propager et amplifier des bactériophages lactiques Réaliser des titrations de bactériophages Mettre en collection et conserver des bactériophages lactiques</p>
<p>Stage 45 «Techniques moléculaires pour l'identification et la caractérisation des bactériophages lactiques»</p>	<p>ACTALIA La Roche-sur-Foron Octobre 2017 2 Jours Niveau Expert</p>	<p>Objectifs : Extraire l'ADN phagique des bactériophages lactiques Identifier et caractériser des bactériophages lactiques par PCR spécifiques et profil de restriction</p>

NB : Les descriptifs complets des stages sont disponibles sur notre site : www.anfopeil-enil.fr
N'hésitez pas à contacter le Réseau des ENIL/ANFOPEIL pour toute demande de formation « à la carte » sur ces thématiques ou d'autres.

Le réseau des ENIL/ANFOPEIL

BP 10025 • 39801 POLIGNY CEDEX
Tél : 03 84 37 27 24 • Fax : 03 84 37 08 61
accueil@anfopeil-enil.fr

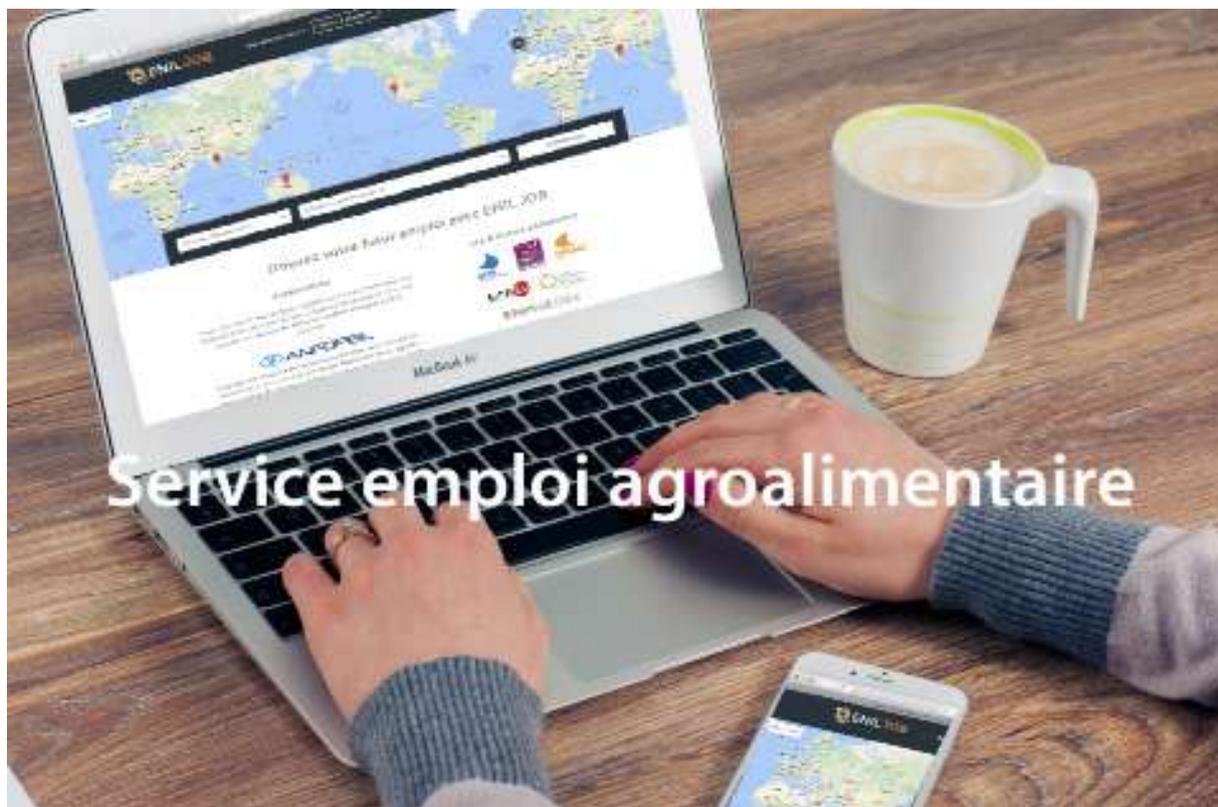
Responsable administrative

Christine GRILLOT
christine.grillot@anfopeil-enil.fr

Coordinateur - Responsable pédagogique :

Thierry MICHELET : thierry.michelet@anfopeil-enil.fr
06 44 71 15 83





Service emploi agroalimentaire



SERVICE EMPLOI du réseau des 6 ENIL de France (ECOLE NATIONALE D'INDUSTRIE LAITIÈRE ET AGROALIMENTAIRE)



Un service qui vous met en relation avec des candidats **motivés, diplômés** et **compétents** dans les secteurs qui **vous intéressent** !

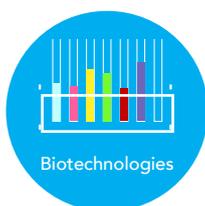
- Diffusion et Consultation d'offres en ligne
- Accès à la CVthèque
- Contact direct avec les candidats
- Affichage des offres dans les ENIL
- Suivi des offres
- Gratuité des offres de stage



Qualité



Agroalimentaire



Biotechnologies



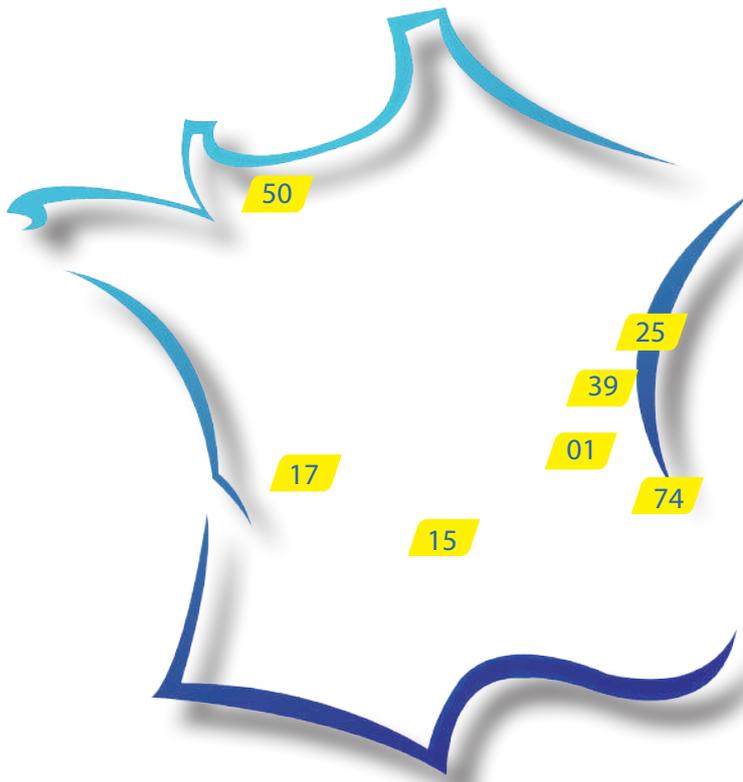
Fromagerie



Eau et
Environnement

Pour diffuser une offre d'emploi ou une offre de stage :
Créez un compte en ligne sur www.eniljob.fr ou contactez-nous

LES ENIL VOUS ACCUEILLENT



ENIL
25620 MAMIROLLE
 Tél. 03 81 55 92 00
 Fax 03 81 55 92 17
DIRECTRICE : G. FOURNIER
 Conseiller Formation : C. MOINE
 E-mail : claude.moine@educagri.fr

Portes ouvertes le
4 Février et 11 Mars 2017

01



ACTALIA
01000 BOURG-EN-BRESSE
 Tél. 04 92 34 71 86
 Fax 04 92 34 72 97
DIRECTEUR PRODUITS LAITIERS : J.M. HÉRODET
 Conseillère Formation : S. FONTAINE
 E-mail : s.fontaine@actalia.eu

39



ENILBIO
39801 POLIGNY
 Tél. 03 84 73 76 76
 Fax 03 84 37 07 28
DIRECTRICE : G. FOURNIER
 Conseiller Formation : I. FRIMOUT
 E-mail : isabelle.frimout@educagri.fr

Portes ouvertes le
4 Février et 11 Mars 2017

15



ENILV
15000 AURILLAC
 Tél. 04 71 46 26 60
 Fax 04 71 46 26 40
DIRECTEUR : J.P. CHAPUT
 Conseillère Formation : C. ARSAC
 E-mail : celine.arsac@educagri.fr

Portes ouvertes le
11 Février et 9 Mars 2017

50



ENIL
50620 LE HOMMET D'ARTHENAY
 Tél. 02 33 77 80 82
 Fax 02 33 77 80 84
DIRECTRICE : F. MARTIN
 Conseillère Formation : A. deschenes
 E-mail : agnes.deschenes@educagri.fr

Portes ouvertes le
28 Janvier et 11 Mars 2017

17



ENILIA
17700 SURGÈRES
 Tél. 05 46 27 69 00
 Fax 05 46 07 31 49
DIRECTEUR : M. FAOURI
 Conseiller Formation : E. AUDEBERT
 E-mail : emmanuel.audebert@educagri.fr

Portes ouvertes le
4 Février et 13 Mai 2017

74



ENILV
74805 LA ROCHE-SUR-FORON
 Tél. 04 50 03 47 13
 Fax 04 50 97 61 23
DIRECTRICE : V. DROUET
 Conseillère Formation : J. DEBALLON
 E-mail : julie.deballon@educagri.fr

Portes ouvertes le
11 Février et 18 Mars 2017