

PROCEDURE DE MISE EN ŒUVRE DU TEST DE LACTOFERMENTATION

Objectifs du test : Obtenir une indication globale de la valeur fromagère des laits d'un point de vue microbien.

Principes du test : Basé sur la coagulation acide du lait par floculation des protéines, ce test permet de suivre le comportement de l'écosystème microbien du lait dans des conditions définies par celles du test (couple temps / température) en observant, au travers de l'aspect du coagulum, l'effet de la croissance conjointe des différentes microflore du lait (compétition, synergie) indépendamment des autres éléments ajoutés au lait pour le transformer en fromage (ferment, présure, ...). Il permet d'émettre des hypothèses sur la prédominance de microflore d'altération et la charge microbienne globale des laits et de mesurer l'aptitude à l'acidification des laits.

Introduction : La lactofermentation est un test mis en œuvre en routine dans certaines filières, notamment en Comté, pour évaluer la valeur fromagère des équilibres microbiens du lait cru. Ce test a aussi été utilisé soit pour caractériser des réservoirs de flores ensemencant le lait cru, comme la machine à traire, en faisant circuler dans celle-ci du lait UHT ensuite mis en fermentation, soit pour évaluer l'influence des pratiques de traite, dont l'hygiène de traite sur la qualité microbiologique fromagère des laits. Le couple temps / température de référence utilisé lors de ce test est historiquement 24h à 37°C. Ce test peut facilement être adapté à la technologie fromagère mise en œuvre. Mais, afin de comparer les résultats de différentes études, il est souhaitable d'adopter un protocole commun pour une technologie fromagère donnée. Cette fiche décrit le protocole 24h à 37°C et les différentes variantes connues.

Liste du matériel nécessaire :

Objectif	Matériel
Prélèvement aseptique de lait dans un contenant stérile	<ul style="list-style-type: none"> • Pipette graduée stérile pour chaque lait et pro-pipette ou verser directement dans le tube en veillant de ne pas incorporer d'air • Tubes à essai stériles de 20 ml en verre (à défaut en plastique) • Bouchon type capotest / vis / film de paraffine
Stérilité de la zone de travail	Bec bunsen / hotte de laboratoire à flux laminaire
Incubation des laits	<ul style="list-style-type: none"> • Bain-marie thermostaté (+ thermomètre en vérification) / étuve / aquarium + thermoplongeur d'aquariophilie avec bulleur • Portoir pour les tubes
Mesure du pH	pH-mètre avec sonde à immersion
Mesure de l'acidité Dornic	Burette graduée, soude à N/9 (0,111 mol/L), phénolphaléine en solution alcoolique à 2%
Appréciation du gel	Référentiel photos

1) PROTOCOLE DE REALISATION DES LACTOFERMENTATIONS 24 H A 37°C.

- Avoir préalablement prélevé de façon aseptique un échantillon de lait à l'aide d'un contenant stérile de volume supérieur à 20 ml.
- Travail en conditions stériles (bec bunsen / hotte à flux laminaire).
- Régler le bain-marie (ou étuve) à 37°C, au moins une heure avant son utilisation (attention le bain-marie ne doit pas vibrer).
- Déposer, sans incorporer trop d'air, 20 ml de lait dans un tube stérile 16x160mm en verre si possible (ou 18x180mm) ; toujours prendre le même volume et le même type de tube si on veut comparer dans le temps l'aspect des gels.

- Fermer le tube stérile (soit une fermeture hermétique : vis ou film de paraffine, soit fermeture non hermétique : capotest).
- Placer le tube sur un portoir au bain marie (ou à l'étuve) à 37°C.
- Si on utilise un bain-marie, vérifier que le niveau de l'eau dépasse un peu la hauteur de lait dans le tube sur la durée de la lactofermentation.
- Laisser incubé 24 heures.

EVALUATION DE LA NATURE DES FLORES, A PARTIR D'UN REFERENTIEL PHOTOS PREALABLEMENT ETABLI :

- Evaluer visuellement le coagulum et classer l'**aspect** obtenu au terme des 24 heures dans un des types référencés. Attention au bouchon de crème qui peut faire croire qu'il y a un gel alors que le lait est resté liquide.

EVALUATION DE LA CAPACITE ACIDIFIANTE DU LAIT :

- Prélever 10 ml de lait supplémentaires avant lactofermentation et en mesurer le pH et/ou l'acidité Dornic.
- En fin de lactofermentation, après avoir évalué visuellement le coagulum, homogénéiser le coagulum et en mesurer le pH (sonde à immersion, avec compensation de température) et / ou l'acidité (titrimétrie). L'écart avec la mesure du pH (et / ou de l'acidité) avant lactofermentation permet d'estimer l'acidification spontanée des laits (ΔpH et/ou ΔD).

Commentaires des auteurs.

Avantages :

- ✓ Méthode peu coûteuse et facile à mettre en œuvre.
- ✓ Intérêt d'utilisation en méthode comparative sur un nombre important d'échantillons de laits.
- ✓ Dans le cadre d'une lactofermentation mésophile (22°C+/-1°C) pour des fabrications lactiques par exemple, on s'intéresse moins à l'aspect du gel qu'à l'acidification. Des adaptations sont donc possibles pour la mise en œuvre de la méthode sur le terrain par les techniciens voire les producteurs : utilisation de tubes en plastique jetables, incubation dans un bain-marie thermostaté artisanal constitué d'un aquarium et d'un thermoplongeur d'aquariophilie avec bulleur, travail près d'un bec de gaz de camping.
- ✓ Pour le technicien, il est possible de réaliser le test de lactofermentation après report du lait à 4°C pendant 12h ou 24h (durée fixe), seulement si le lait est mis en fabrication après un tel report. Dans le cas contraire, le report au froid de l'échantillon perturbe les équilibres de flore, ce qui peut avoir des incidences sur l'interprétation du test. Il est important de réaliser le test dans des conditions similaires à chaque fois pour être comparables.

Limites de la méthode :

- ✓ Les relations entre les aspects des coagulums et la qualité globale des fromages ont été établies en technologies pâte pressée cuite (PPC). Ces liens ne sont pas transférables directement aux autres technologies.
- ✓ Il est important d'utiliser constamment les mêmes paramètres de température et de durée d'incubation pour comparer les laits entre eux car les aspects des coagulums varient significativement d'une température à l'autre.

.../...

* Ou en s'assurant que la mesure de pH est réalisée dans les mêmes conditions de température avant et après lactofermentation

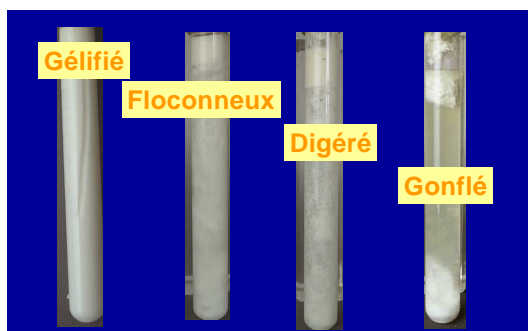
- ✓ Il est important de toujours utiliser le même matériau (verre largement préférable au plastique si l'on veut considérer l'aspect des coagulums) pour les tubes de lactofermentation car l'aspect des gels est modifié par la nature du tube. En effet, le tube plastique, contrairement au tube en verre ne laisse pas passer l'oxygène.
- ✓ Le test donne une indication globale sur la nature des flores et leurs synergies. Il ne dispense pas de l'analyse complémentaire des microflores notamment spécifiques, en particulier les pathogènes et les butyriques...
- ✓ La formation du gel peut être influencée par la composition physico-chimique du lait, surtout si celle-ci se situe dans des extrêmes (urée, TB, TP...).

Aspects des coagulums pouvant être obtenus

Cette description est seulement indicative. La mise en place d'un référentiel photos dans les conditions effectives de mise en œuvre du test est indispensable afin de comparer les lactofermentations.

Aspect	Définition
Liquide	Absence totale de coagulation voire aspect « caillé liquide qui colle à la paroi du tube »
Géliné / gélatineux	Gel homogène, caillé ferme, pas ou peu d'exsudation de sérum voire présence de quelques petites bulles de gaz régulières
Floconneux	Coagulum régulier, apparition de flocons ou grumeaux avec exsudation de sérum blanc laiteux
Caséeux	Coagulum contracté avec exsudation de sérum verdâtre à laiteux, parfois coagulum en forme de bâtonnet et filandreux
Gonflé / gel à bulles	Caillé d'aspect spongieux, dégageant de nombreuses bulles de gaz, irrégulières, avec expulsion de sérum, odeur désagréable
Digéré	Caillé digéré parfois en forme d'éponge, avec expulsion de grande quantité de sérum, formant des poches

Références : Michel *et al.* (2001), Bérodié *et al.* (2001), Raynaud *et al.* (2008)



Photos : Centre Technique des Fromages Comtois.

2) VARIANTES DES LACTOFERMENTATIONS 24 H A 37°C, SANS AJOUT DE FERMENTS EXOGENES :

Ces variantes permettent de se placer à des températures plus proches des températures de fabrication observées pour une technologie donnée, et d'être donc plus représentatives de la valeur du lait pour cette technologie.

Couple Temps/ température*	Commentaires : intérêts du test
24 h à 37°C (+/- 1°C)	<p>BERODIER et al. (2001) : N = 227 laits de troupeaux. Mise en relation des aspects des coagulums et des ΔpH avec les caractéristiques sensorielles des fromages en PPC (Comté)</p> <p>CTFC (2007) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evolution des résultats de lactofermentation pendant la traite • Incidence des pratiques d'hygiène sur la lactofermentation <p>MICHEL et al. (2001) : N = 158 laits de troupeaux.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mise en relation des aspects des coagulums et de leur pH avec les microflores des laits • Mise en relation des aspects des coagulums et de leur pH avec les conditions de production
24 h à 33°C (+/- 1°C)	<p>PELLISSIER et al. (2009) : N = 24 laits de tanks avant « report expérimental » (issus de 4 exploitations), 144 laits de tanks (issus de 4 exploitations) après report expérimental.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Effet du report expérimental sur les aspects des coagulums et sur les ΔpH
24 h à 27°C (+/- 1°C)	<p>RAYNAL-LJUTOVAC et al. (2006) : N = 55 laits de troupeaux.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Température représentative de la température après 24h d'emprésurage en fabrication de caillés lactiques doux type Banon, • Compromis entre les températures d'emprésurage et de fin de fabrication de certains caillés type présure, • Etude du rapport entre la cinétique d'acidification et le potentiel inhibiteur de certains laits vis-à-vis du développement de <i>S. aureus</i>.
24 h à 22°C (+/- 1°C)	<p>CASDAR acidification (2008 – 2010) : N = 50 laits (issus de 50 exploitations) et N = 69 (issus de 8 exploitations). Intérêt en technologie lactique</p> <p>RAYNAUD et al. (2008) : N = 32 laits (issus de 5 exploitations), et différents essais avec 9 à 12 laits (issus de 8 exploitations). Optimisation de la mise en œuvre du test en technologie lactique ; simplification du test pour une utilisation à la ferme.</p>
24h puis 48h à 23°C / (+/- 1°C)	<p>BONETTI (2000) : N = 76 laits de troupeaux,</p> <ul style="list-style-type: none"> • Intérêt en technologie lactique (St Marcellin) • Indicateur du goût du lait, des fromages, cinétique d'acidification
24h à 20°C ou 22°C	<p>LAITHIER et al. (2005) : N= 50 laits UHT.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Circulation du lait UHT dans la machine à traire puis incubation pour évaluer l'aptitude acidifiante de ce réservoir de microflores <p>CASDAR acidification (2008 – 2010) : N = 40 laits UHT conservés congelés à -18°C, avant le test.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Circulation de lait UHT dans la machine à traire puis incubation pour évaluer l'aptitude acidifiante de ce réservoir de microflores • Incubation dans du lait UHT de chiffonnettes de trayon pour évaluer l'aptitude acidifiante des microflores des trayons

* La modification par rapport au test de référence apparaît en gras.

PROGRAMMES DE RECHERCHE AYANT MIS EN ŒUVRE CE TEST / PUBLICATIONS OU RAPPORTS D'ETUDES :

- BERODIER A., PARGUEL P., DASEN A., DUBOZ G., RENAUD J.P., BILLOT M., BERODIER F., DUCRET J.B., MARGUET B., 2001. Validation du test de lactofermentation en filière Comté (1999 – 2000). Etude interne. Comité Technique du Comté Poligny. 90p.
- BONETTI B., 2000. Caractérisation du potentiel fermentaire et du potentiel goût des laits du Saint-Marcellin ; relation avec les conditions de production. Compte-rendu d'étude. (Etude PEP bovins lait Rhône-Alpes).

- CASDAR acidification, 2008 – 2010. Contribuer à la performance technico-économique des exploitations fromagères fermières en améliorant la maîtrise technologique et la qualité des fromages. Chef de file : Institut de l'Elevage, chef de projet : Cécile Laithier.
- CTFC, 2007. Evolution du résultat de la lactofermentation pendant la traite. Etude interne
- CTFC, 2007. Incidence des pratiques d'hygiène sur la lactofermentation. Étude interne.
- CTFC, 2008. Incidence du changement de pratiques d'hygiène de traite sur le résultat de lactofermentation. Etude interne.
- LAITHIER C., CHATELIN Y.M., DAVID V., TALON R., LABADIE J., BARRAL J., TORMO H., LEFRILEUX Y., MORGE S., 2005. Améliorer la maîtrise de la qualité des fromages fermiers par une meilleure caractérisation des biofilms et de leur rôle. Edition Technipel 2005, collection résultats. Compte rendu final 150531011, 64 pages.
- MICHEL V., HAUWUY A., CHAMBA JF., 2001. La flore microbienne des laits crus de vache. Diversité et influence des conditions de production. Lait, 81. pp.575-592
- PELISSIER F., PIEDNOIR R.L., DIDIERNE R., MONTEL M.C., 2009. Etude de l'incidence de la durée, de la température et des équilibres microbiens initiaux sur les caractéristiques microbiologiques des laits crus après incubation expérimentale. Rapport d'étude, UMT TREFL Aurillac. 27 pages.
- RAYNAL-LJUTOVAC K., BARRAL J., POUTREL B., BOIVIN J., GABORIT P., DIRBERG R., DE CREMOUX R., 2006. Recherche d'écosystèmes microbiens inhibiteurs de la croissance de *S. aureus* dans le lait de chèvre. Rencontre Recherche Ruminants. 13. pp.416 – 418.
- RAYNAUD S., MINARD L., LEFRILEUX Y., MORGE S., LAITHIER C., BARRAL J., CUVILLIER D., CHATELIN Y.M., LEROUX V., WYON I., 2008. Augmenter la maîtrise de fabrication du caillé en technologie lactique tout en utilisant des flores indigènes et du lait cru. Collection résultats, compte rendu n°15 08 38 002.

Contacts : Fanny PELISSIER, Actilait, 20 côte de Reyne 15000 Aurillac ; f.pelissier@actilait.com Julie BARRAL, Languedoc Roussillon Elevage – Maison des Agriculteurs, chemin de Saporta 34970 Lattes ; julie.barral@lr-elevage.com Antoine BERODIER, CTFC, 9 avenue Wladimir Gagneur, 39800 Poligny ; a-berodier@ctfc.fr Cécile LAITHIER et Sabrina RAYNAUD, Institut de l'Elevage, Agrapole, 23 rue Jean Baldassini, 69364 Lyon cedex 7 ; cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr et sabrina.raynaud@inst-elevage.asso.fr	Crée le : 21/02/2011	Modifiée le :
--	--------------------------------	----------------------

RMT filières fromagères valorisant leur terroir

Appelé "Réseau fromages de terroirs", il a pour vocation de répondre aux sollicitations de filières organisées valorisant les ressources de leurs terroirs (AOP, IGP, fermiers...). Ce RMT regroupe une dizaine de partenaires professionnels, techniques, de la recherche et de la formation.

Ses actions concernent les caractéristiques des fromages en lien avec leurs conditions de production, la gestion des écosystèmes microbiens, l'évaluation de la richesse et de la diversité sensorielle et la durabilité des filières.

Des ouvrages et fiches de synthèse, des outils ou encore des journées de formation/information seront proposés aux filières valorisant leurs terroirs.

Le RMT est co animé par le CNAOL et le Suaci Alpes du Nord.



Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com