



Les lactobacilles hétérofermentaires dans la fabrication du Gruyère

Groupes de discussion

Auteurs

Daniel Goy, John Haldemann, Ernst Jakob



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Département fédéral de l'économie,
de la formation et de la recherche DEFR
Agroscope

Impressum

Auteurs	Daniel Goy, daniel.goy@agroscope.admin.ch John Haldemann, john.haldemann@agroscope.admin.ch Ernst Jakob, ernst.jakob@agroscope.admin.ch
Editeur	Agroscope, www.agroscope.ch
Renseignements	Agroscope, Schwarzenburgstrasse 161, 3003 Berne, Suisse Téléphone : +41 58 463 84 18 bestellung@agroscope.admin.ch
Rédaction	Müge Yildirim, Agroscope
Mise en page	Stämpfli SA, Berne
Impression	Office fédéral des constructions et de la logistique, Berne
Copyright	Reproduction autorisée sous condition d'indication de la source et de l'envoi d'une épreuve à l'éditeur.

ISSN 2296-7230 (Online) / ISSN 2296-7222 (Print)

Table des matières

1. Introduction	4
2. Métabolisme des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	5
3. Présence de lactobacilles hétérofermentaires dans le lait et le Gruyère	6
3.1 Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	6
3.2 Remarques	6
3.3 Les défauts causés par les lactobacilles hétérofermentaires sur les Gruyère sont	6
3.4 Les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires	6
4. Provenance des lactobacilles hétérofermentaires	7
5. Essais effectués	8
5.1 Formation de l'ouverture	8
5.2 Présence de lactobacilles hétérofermentaires dans le lait de chaudière et le Gruyère	8
5.3 Importances des germes hétérofermentaires dans le fromage	8
5.4 Informations relatives aux fromageries ayant participé à l'essai	8
6. Résultats de la chromatographie des Gruyère âgés de 150 jours	10
7. Présence de lactobacilles hétérofermentaires dans les cultures d'exploitation cultivées sur le petit-lait	11
8. Conclusions et recommandations	12

1. Introduction

Les lactobacilles hétérofermentaires font partie de la famille des lactobacilles. Les lactobacilles sont présents naturellement dans la nature et sont rarement pathogènes. Ce sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes de taille variable, asporogènes (ne produisant pas de spores), immobiles, anaérobies facultatifs. Leurs exigences nutritionnelles complexes et leurs températures de croissance (2 à 53 °C) sont très variables d'une espèce à l'autre, mais elles sont toutes acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5,2 à 6,2. Leur inactivation dépend du couple temps/température. Certaines souches survivent à un traitement thermique de 62 °C pendant quelques minutes. Leur mode de fermentation est à la base de la subdivision en trois groupes soit :

- les lactobacilles homofermentaires strictes avec plus de 90% du lactose (glucose et galactose) transformé en acide lactique, les autres produits apparaissent seulement dans des proportions mineures.
- les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LHF) peuvent fermenter le lactose (lactate) et le citrate. Leur

capacité à former de l'acide lactique est souvent modeste. La fermentation du lactose est homofermentaire, mais la fermentation du citrate aboutit à la formation d'autres produits tels que l'acide formique et de l'acide acétique.

- les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires (LHO) fermentent le lactose en lactate et acétate. Ce groupe de lactobacilles a également un faible pouvoir acidifiant, mais produit des substances aromatiques.

Les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires peuvent produire :

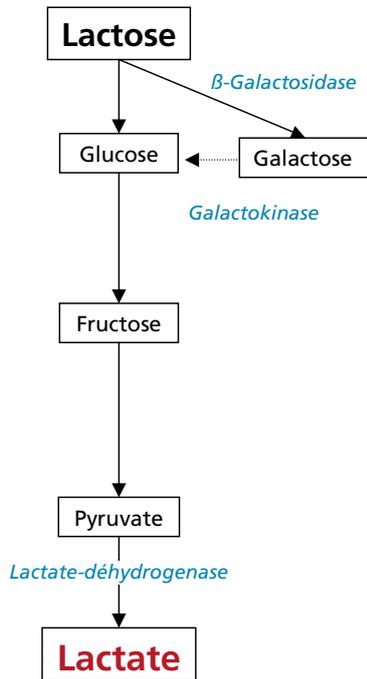
- de l'acide lactique
- de l'acide acétique
- de l'acide formique
- de l'éthanol
- du gaz carbonique
- d'autres substances, par exemple des substances aromatiques

Tableau 1 : Classification des lactobacilles

Lactobacilles		
homofermentaires strictes	hétérofermentaires facultatifs	hétérofermentaires obligatoires
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. casei ssp. casei</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>Lb. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. buchneri</i>
		<i>Lb. parabuchneri</i>

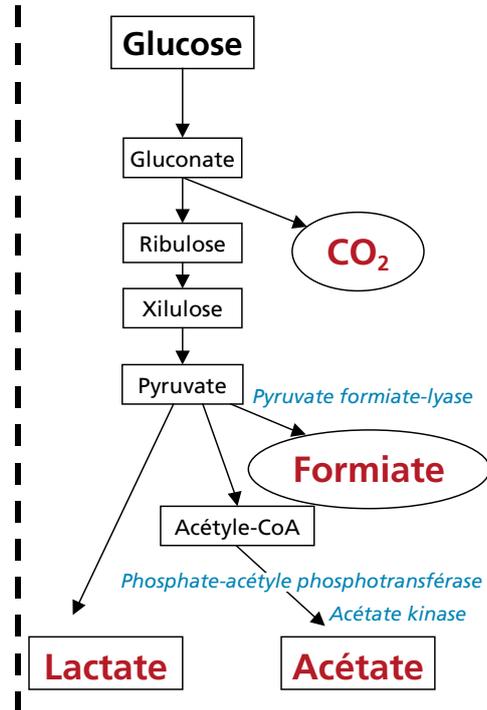
2. Métabolisme des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

Présence de lactose



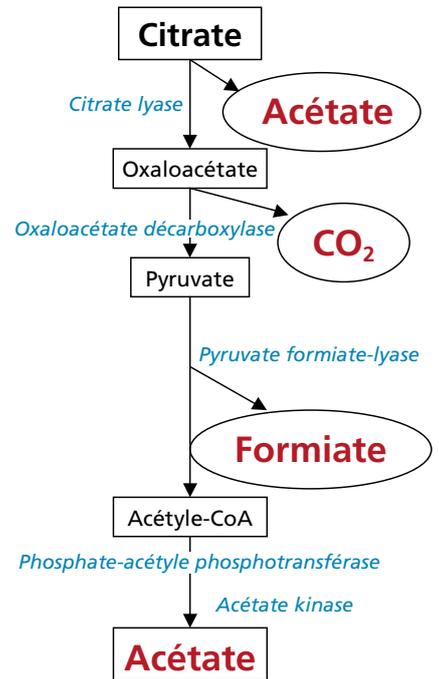
Fermentation
homolactique

Concentration en sucre limitante



Fermentation
hétérolactique

Absence de sucre



Utilisation
du citrate

Figure 1 : Dégradation des carbohydrates par les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

3. Présence de lactobacilles hétérofermentaires dans le lait et le Gruyère

3.1 Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

Les analyses du lait cru lors de la recherche des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont effectuées avant tout pour la fabrication du Gruyère car, tout comme les bactéries propioniques, elles peuvent provoquer des fermentations secondaires et des lainures.

Les normes :

Lait de producteurs :	< 30 UFC/g
Lait de chaudière :	< 100 UFC/g
Cultures :	< 10 UFC/g
Gruyère 1 jour :	< 100 UFC/g
Gruyère 30 jours :	< 10 000 000 UFC/g
Gruyère 150 jours :	< 20 000 000 UFC/g

3.2 Remarques

Lors d'une maturation prolongée, les germes hétérofermentaires s'autolysent par manque de substrat.

Dans des conditions de maturation idéales, certains germes hétérofermentaires facultatifs participent à la formation de l'arôme du Gruyère, mais selon le type ou les conditions d'affinage, ils peuvent favoriser l'apparition de défauts. Une teneur en acide formique supérieure à 1 mmol/kg ou une teneur en citrate inférieure à 7.5 mmol/kg nous indique la croissance de lactobacilles hétérofermentaires.

Certaines souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ont la particularité de se protéger en s'encapsulant. La capsule est une structure extérieure provisoire (qui s'installe dans des conditions de survie !). Elle entoure la bactérie. Sa constitution est le plus souvent formée de polysaccharides, parfois de protéines. Pour la mettre en évidence au microscope, on réalise une suspension dans l'encre de chine et on observe la capsule sous forme d'un halo clair et réfringent. La photo de droite nous présente des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs enrobés (*Lb rhamnosus* NCTC 10302).



Photo 1 : bactéries non protégées

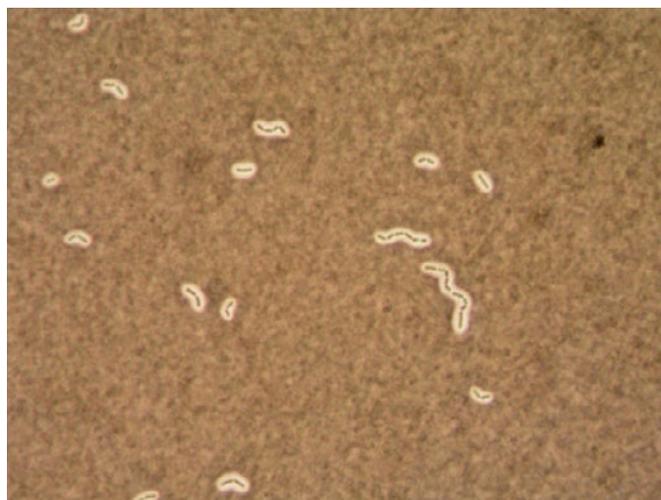


Photo 2 : bactéries protégées par une capsule

3.3 Les défauts causés par les lactobacilles hétérofermentaires sur les Gruyère sont

Ouverture

- Nids
- Lainure
- Grosse ouverture
- Gonflement précoce

Défauts de goût

- Impur
- Brûlant, piquant

en considération en tant que responsables d'une ouverture défectueuse.

De plus, les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires sont aussi à l'origine de fermentations secondaires et de défauts de goût, parce qu'ils peuvent transformer l'acide aminé histidine en histamine en scindant le groupe CO₂. L'histamine, dans des quantités importantes, peut-être toxique, le seuil de tolérance est d'environ 500 mg/kg. Elle se caractérise aussi par un fort goût brûlant.

3.4 Les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires

Il est rare que l'on effectue des analyses par rapport aux lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. Cependant, ces germes en nombre suffisamment élevé sont en mesure de former du gaz dans le fromage frais déjà en cours de la dégradation du lactose. De ce fait, les bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires doivent toujours être prises

4. Provenance des lactobacilles hétérofermentaires

Sur le marché, il existe plusieurs types de conservateurs de fourrage contenant des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ou des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. Jusqu'à ce jour nous n'avons pas pu lier des problèmes de fermentations indésirables ou des goûts impurs dans le fromage avec la présence de ce type d'additif dans les fourrages (en principe ces produits sont employés comme conservateur pour les ensilages).

Dans la fabrication du Gruyère, malgré plusieurs essais, les sources de contamination et le développement de ces microorganismes sont encore relativement mal connues, mais certaines fromageries ont fréquemment des valeurs en acide formique trop élevées se traduisant par une ouverture non désirée ou un goût impur.

5. Essais effectués

5.1 Formation de l'ouverture

Jusque dans les années 1990, lorsque la présence de trous de la taille d'un petit pois était une exigence pour obtenir la note maximum au critère de l'ouverture, Agroscope avait testé différentes souches de lactobacilles hétérofermentaires. Les résultats obtenus étaient en demi-teintes.

Une majorité des souches testées favorisait l'apparition de défauts d'ouverture (grosse ouverture, lainure, éraillure) et de goût (impur, piquant). Quelques souches avaient tout de même donné des résultats concluants. Ce type d'essai a été abandonné lorsque la présence d'ouverture a perdu de son importance lors de la taxation du Gruyère.

Par contre trois cultures de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (CM 3008 et 3010 [*Lactobacillus casei*], CM 3012 [*Lactobacillus rhamnosus*]) sont commercialisées par Agroscope. Elles sont utilisées dans la production de l'Emmentaler pour la prévention de la fermentation secondaire et la régulation de l'ouverture et dans les fromages à pâte mi-dure pour la formation de l'ouverture.

L'ensemencement de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs dans le lait de chaudière freine la croissance non seulement les bactéries propioniques, mais également des entérocoques. Dans les fromages à pâte mi-dure, la culture peut également avoir un effet contre les points bruns (colonies propioniques ou d'entérocoques).

5.2 Présence de lactobacilles hétérofermentaires dans le lait de chaudière et le Gruyère

Dans un essai pratique effectué par Agroscope plus de 100 génotypes différents ont été identifiés dans des laits de chaudière. Dans les Gruyère fabriqués avec ce lait, seuls 3 lactobacilles casei ont été retrouvés dans les fromages âgés de 8 mois.

Dans ce même essai, les LHF ont été identifiés sur les productions de Gruyère de 3 fromageries durant 6 mois. Sur ces 18 échantillons, 45 souches présentant un génotype différents ont été dénombrés. Fait particulier, de mois en mois les génotypes identifiés étaient différents dans une même fromagerie. Dans cet essai on a estimé que la flore native participait au développement de la saveur des Gruyère. En effet, il semble que la présence de certaines souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs n'amènent pas de défaut et favorise le développement de l'arôme dans le fromage.

5.3 Importances des germes hétérofermentaires dans le fromage

Dans un autre essai pratique, Agroscope a recherché la présence dans le lait de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et leurs comportements lors de l'affinage du Gruyère. Pour ce faire, 5 fromageries ont été choisies, réparties dans la zone de production du Gruyère. Au cours de l'essai les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ont été analysés depuis le lait de mélange jusque dans le Gruyère à 150 jours. De plus, plusieurs autres analyses ont été effectuées dont le citrate, les acides gras volatils et une appréciation a été effectuée à 150 jours.

5.4 Informations relatives aux fromageries ayant participé à l'essai

Tableau 2: Quelques informations sur le processus de fabrication et les températures d'affinage

Fromagerie	A	B	C	D	E
Utilisation de caillettes	non	non	non	oui	non
Température de chauffage du caillé [°C]	57.0	58.0	59.0	57.8	57.5
Brassage final [min]	6	6	3	10	5
Température des caves [°C]	15	14	14	16	16

Remarques:

- la fromagerie D emploie des caillettes pour la préparation de ses cultures.
- la température de chauffage à 59°C est élevée et peut favoriser la germination des spores butyriques.

dans le caillé avant sortie, les LHF ne sont plus quantifiables dans le Gruyère d'un jour.

La présence des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs a été quantifiée depuis le lait avant la réception jusque dans les Gruyère âgés de 150 jours.

Les laits de producteurs ont été prélevés d'une manière aliquote avant qu'ils entrent dans la fromagerie. La figure n° 2 nous montre que malgré une présence entre 10^2 et 10^3

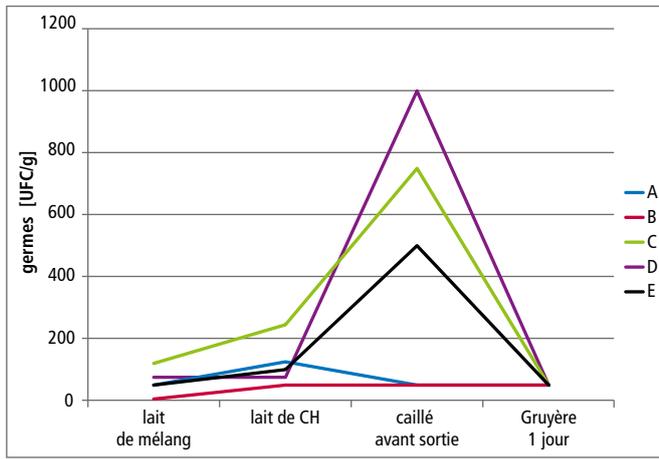


Figure 2: Croissance et décroissance des germes hétérofermentaires facultatifs, du lait de mélange au Gruyère à 1 jour

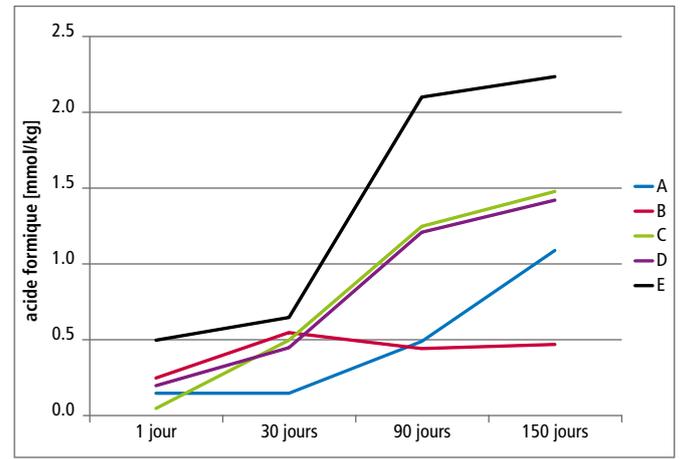


Figure 4: Teneurs en acide formique dans les Gruyère d'un jour à 150 jours.

Durant les trente premiers jours de l'affinage du Gruyère, l'activité des germes hétérofermentaires facultatifs est intense (figure n° 3). Si le gaz (CO₂) produit ne peut pas diffuser à l'extérieur de la meule, celui-ci s'accumulera dans la pâte en provoquant une ouverture indésirable surtout si la pâte est trop courte.

Les LHF dégradent le citrate pour en produire de l'acide formique. La consommation de citrate est très faible dans les Gruyère produits dans les fromageries A et B tandis qu'elle est importante dans les Gruyère fabriqués dans la fromagerie E. C'est également dans cette fromagerie que l'on a quantifié le nombre de lactobacilles hétérofermentaires le plus important (~50 millions à 90 jours).

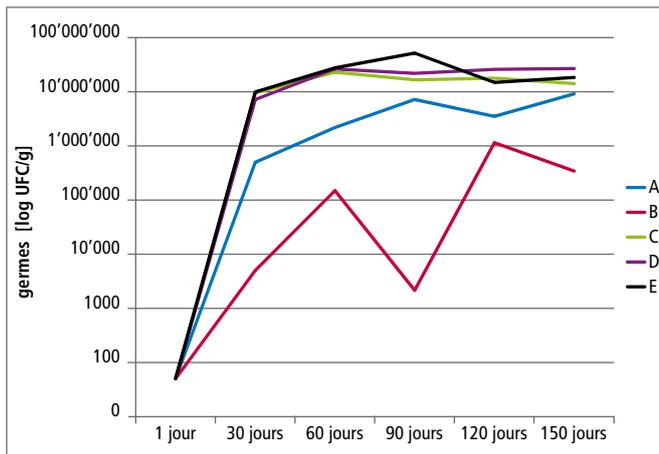


Figure 3: Développement des germes hétérofermentaires facultatifs dans le Gruyère d'un jour à 150 jours.

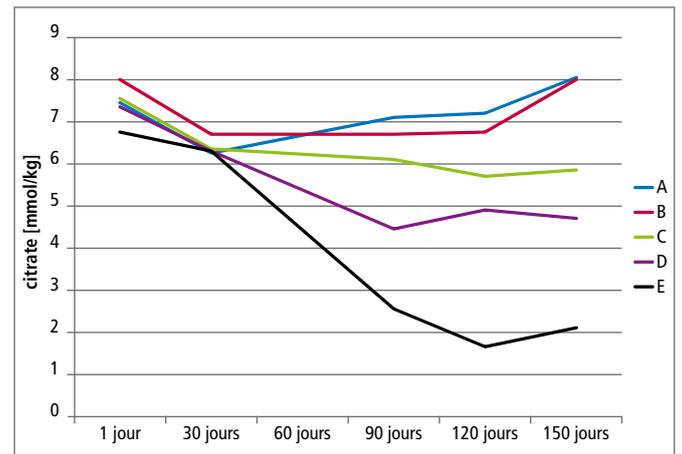


Figure 5: Teneurs en citrate dans les Gruyère d'un jour à 150 jours.

Sur cette figure on peut voir que depuis le trentième jour, le nombre de *germes hétérofermentaires facultatifs* est presque stable avec une tendance à diminuer.

En parallèle la quantité d'acide formique augmente comme nous le montre la figure n° 4. Dans 3 lots de Gruyère, les valeurs sont supérieures à la valeur de tolérance fixée par Agroscope (fromageries C, D et E). Ce sont également ces fromageries qui ont environ 10 millions de germes hétérofermentaires à 30 jours.

6. Résultats de la chromatographie des Gruyère âgés de 150 jours

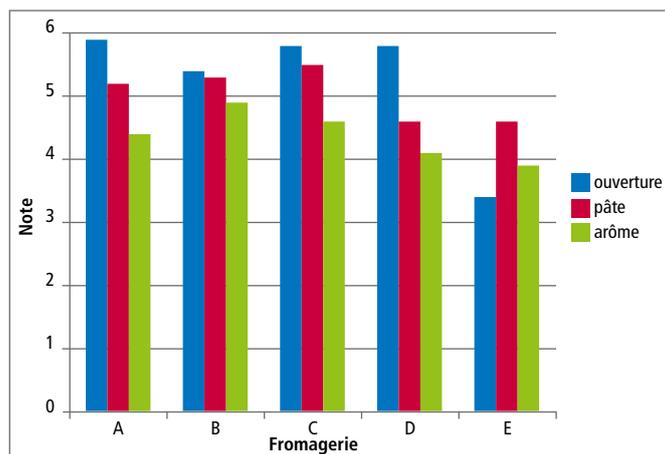
Une chromatographie a également été réalisée sur les fromages provenant des 5 fromageries. Malgré une appréciation sensorielle qualifiée d'en ordre pour les productions des fromageries A, B, C, D, on constate que quelques te-

neurs sont hors des normes. Les fromages fabriqués dans la fromagerie E ont une ouverture chargée et une pâte dure et cassante.

Tableau 3 : Chromatographie des Gruyère âgés de 150 jours

		From. A	From. B	From. C	From. D	From. E	Normes
		[mmol/kg]	[mmol/kg]	[mmol/kg]	[mmol/kg]	[mmol/kg]	[mmol/kg]
A.G. volatils totaux		17.7	9.7	23.0	16.0	26.0	< 20
Acide formique	C 1	1.1	0.5	1.5	1.4	2.2	< 1.1
Acide acétique	C 2	9.5	7.2	9.8	11.2	15.9	
Acide propionique	C 3	0.7	0.7	5.4	1.9	3.8	< 2.0
Acide i-butyrique	i-C 4	0.7	0.1	0.1	0.1	0.0	
Acide n-butyrique	n-C 4	4.5	0.9	5.7	1.1	2.7	
Acide i-valérique	i-C 5	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	
Acide i-caproïque	i-C 6	0.7	0.0	0.1	0.0	0.0	
Acide n-caproïque	n-C 6	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	< 0.3
Acide butyrique fermentaire		4.0	0.5	4.8	0.5	2.0	< 1.5

Ces Gruyère ont été appréciés à 150 jours par des membres de la commission qualité de l'interprofession du Gruyère, les fabricants ayant participé à l'essai et des collaborateurs d'Agroscope. Les Gruyère ont été jugés sur une échelle de 1 à 6 (1 mauvais, 6 excellent). Les critères pris en compte sont l'ouverture, la pâte et l'arôme. Le graphique nous montre que les fromages produits dans la fromagerie E sont les moins bien appréciés. De plus, les 3 exploitations avec des teneurs en acide formique supérieures à 1,1 mmol/g ont les notes d'arôme les plus basses (fromageries A, D et E).



Graphique 6 : appréciation des Gruyère à 150 jours [échelle de 1 à 6]

7. Présence de lactobacilles hétérofermentaires dans les cultures d'exploitation cultivées sur le petit-lait

Les cultures préparées à partir de petit-lait mûri contiennent souvent des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et quelques fois des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. Sur huit analyses de petit-lait mûris effectuées chez Agroscope, toutes contenaient des lactobacilles hétérofer-

mentaires facultatifs avec des valeurs se situant de 10 à plus de 20 000 ufc/g (moyenne 2 500 ufc/g) et trois échantillons présentaient des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires (moyenne 250 ufc/g).

Tableau 4: Dénombrement des bactéries dans des petits laits mûris

Type de culture	Bactéries lactiques millions ufc/g	LHF ufc/g	LHO ufc/g	Entérocoques ufc/g
PLM 1	380	15	< 1	90
PLM 2 *	250	10	< 1	< 1
PLM 3*	145	25	< 1	< 1
PLM 4	260	55	< 1	5
PLM / CMB 1 *	100	130	75	< 1
PLM / CMB 2 *	255	20 500	600	6
PLM / CMB 3	85	350	< 1	21
PLM / CMB 4	195	50	20	1

Dans quatre exploitations, (identifiées par *) de petites quantités de caillettes sont ajoutées à la culture. Cet ajout n'a apparemment pas d'influence négative. La qualité microbiologique est égale aux autres cultures. Il faut préciser que ces caillettes sont ajoutées à la culture le soir après environ 8 heures d'incubation.

8. Conclusions et recommandations

Actuellement, il n'est pas encore possible de caractériser toute la flore native des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires présente dans le lait. De plus, cette flore est très variable au cours des saisons dans la même entreprise, elle est susceptible de coloniser le matériel de fromagerie en formant des biofilms. Dans la production du Gruyère leur présence n'est pas souhaitée, il est donc nécessaire de mettre des barrières afin d'éviter leurs développements. Il est recommandé de :

- éviter une quantité de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ou de lactobacilles hétérofermentaires obligatoires trop élevée dans le lait de chaudière,
- analyser régulièrement les petit-lait muris et les laits de chaudière,
- éviter la présence de micro poussière, celle-ci crée des points faibles dans la cohésion de la pâte,
- définir un bon compromis entre le chauffage du caillé et la durée du brassage après le feu. Attention, une température supérieure à 58,0°C peut favoriser la germination des spores butyriques,
- éviter de créer des places tendres à la surface du fromage lors de la mise en moule du caillé,
- favoriser une température d'affinage inférieure à 14,5°C en évitant des élévations de celle-ci en cours d'affinage car, lors de l'élévation de la température, le CO₂ emprisonné dans l'eau libre est libéré,
- garder tout au long de la maturation une certaine souplesse de la pâte, pour permettre au CO₂ de diffuser vers l'extérieur de la meule (spécialement les 3 premiers mois de l'affinage). Pour ce faire, il est important de garder un taux d'humidité élevé (>90 %) dans la cave et éviter le graissage des fromages afin de garder la croûte la plus perméable possible.
- se souvenir également que certaines souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs se développent dans le Gruyère