

Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers

Les consommateurs sont de plus en plus attentifs aux qualités sanitaire et sensorielle des produits laitiers et des fromages en particulier. Ces qualités dépendent en grande partie de la composition et de la vie des communautés microbiennes, en perpétuelle évolution lors de la fabrication et de l'affinage des fromages. Elles doivent maintenant être réfléchies dans le cadre de plus en plus strict de la législation européenne en matière de normes microbiologiques. Le contrôle de ces communautés microbiennes, pour favoriser les flores utiles et inhiber les flores pathogènes, est donc un des facteurs-clés de la maîtrise de la qualité des fromages. Il est particulièrement complexe car la vie de ces communautés résulte toujours d'interactions -synergie, antagonisme, compétition- entre les microorganismes, répondant à des changements environnementaux (combinaison de stress divers pH, sel, acides) et interagissant avec les structures physiques (répartition, attachement) et les constituants biochimiques du lait puis du fromage. La maîtrise de la communauté microbienne débute dès l'élevage, d'une part parce qu'une partie d'elle est présente dans le lait de fabrication et, d'autre part, parce que la composition biochimique de la matière première lait, qui dépend des conditions d'élevage des animaux, va influencer la vie des populations microbiennes. Elle doit être effective tout au long de la fabrication et de l'affinage.

La maîtrise de cette vie microbienne implique :

- de connaître la diversité microbienne des laits et de cerner les facteurs d'amont qui en sont à l'origine. La composition des communautés microbiennes est généralement simple et connue dans les fabrications au lait pasteurisé ou microfiltré puisque les communautés microbiennes sont détruites puis reconstituées. Elle est en revanche beaucoup plus complexe, aussi bien en termes d'espèces que

de souches, dans les fromages au lait cru car le lait ne subit aucun traitement pour réduire la flore microbienne ;

- de suivre tout au long de l'affinage l'évolution de la structure de ces communautés microbiennes et leurs activités aussi bien à cœur qu'en surface des fromages. En termes d'espèces, la diversité microbienne à la surface des fromages est particulièrement importante, originale et méconnue (Irlinger 2000) ;

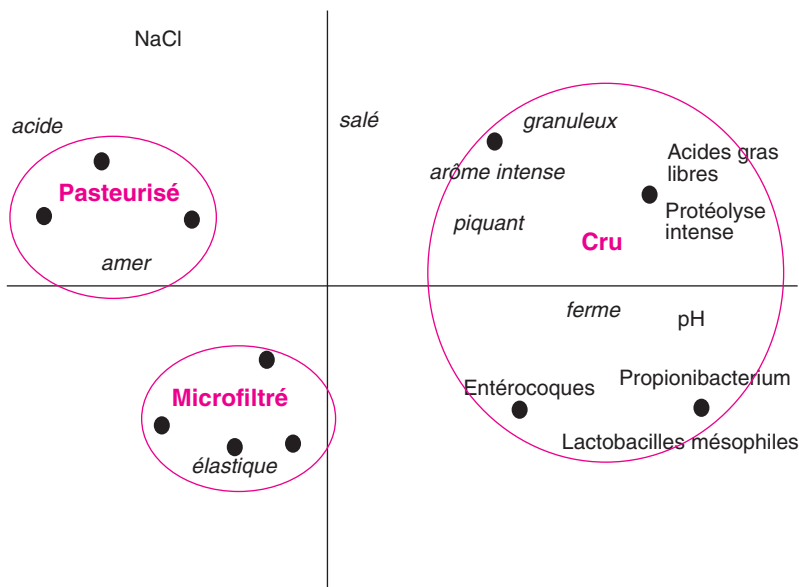
- de comprendre la vie dynamique de ces communautés microbiennes. Comment les microorganismes cohabitent, vivent, meurent et se lysent ? Comment répondent-ils aux changements environnementaux ? Comment interagissent-ils avec les matrices fromagères ?

Après avoir illustré au travers de quelques exemples que les communautés microbiennes sont effectivement la clef de voûte dans l'élaboration des qualités des fromages, nous soulignerons l'intérêt d'évaluer la diversité microbienne, en particulier celle du lait en relation avec les facteurs de production.

Diversité microbienne et diversité sensorielle

La composition des communautés microbiennes des fromages au lait cru intervient dans l'élaboration de leurs caractéristiques sensorielles. Ainsi, les fromages de type pâte pressée cuite, fabriqués au lait cru et présentant des niveaux élevés de flores microbiennes, ont une saveur plus prononcée que ceux fabriqués avec du lait pasteurisé ou microfiltré avec un ensemencement simplifié (figure 1 ; Grappin et Beuvier 1997). En revanche, les fromages au lait microfiltré sont plus acides et amers. L'addition de flores microbiennes dans du lait pasteurisé restitue une partie des caractéristiques des fromages au lait cru (Beuvier *et al* 1997). Rehman *et al* (2000) ont obtenu des résultats similaires sur

Figure 1. Effet de la flore du lait sur les caractéristiques sensorielles de minifromages type gruyère suisse (d'après Beuvier et al 1997).



du fromage Cheddar en montrant d'une part que les fromages au lait cru avaient un arôme plus intense et étaient plus fruités et piquants que des fromages au lait pasteurisé, d'autre part que l'addition de lait cru dans du lait pasteurisé augmentait d'autant plus l'intensité de l'arôme des fromages que cette proportion de lait cru était plus importante. De même, Buchin *et al* (1998), en comparant des fromages de type Morbier fabriqués avec du lait cru ou du lait pasteurisé, ont confirmé la plus forte intensité d'arômes des fromages au lait cru, caractérisés par des arômes animal, épicé, alliacé, rance et piquant. Les fromages au lait pasteuriséensemencés avec des ferments commerciaux se caractérisent par des arômes de lait et fruité. Ces différences sensorielles ont été mises en relation avec des différences de profils de molécules aromatiques. Ainsi, les fromages au lait cru contiennent plus de composés soufrés et d'éthanol alors que les fromages au lait pasteurisé sont plus riches en cétones. L'addition de diverses communautés microbiennes dans un même lait microfiltré induit des différences de caractéristiques sensorielles des fromages de type Gruyère (Demarigny *et al* 1997). Des différences de caractéristiques sensorielles de fromages à pâte pressée non cuite type Salers ont également pu être générées en inoculant du lait pasteurisé avec différentes communautés microbiennes récupérées par microfiltration de lait collecté dans un récipient en bois (gerle) (Callon *et al*, non publié).

Les flores microbiennes pourraient aussi exercer un rôle de barrière vis-à-vis des espèces pathogènes (Brouillaud-Delattre *et al* 1997, Eppert *et al* 1997). Des études sont en cours pour déterminer si les écosystèmes microbiens peuvent inhiber *Listeria monocytogenes* dans les filières fromagères traditionnelles, notamment dans le cas du fromage AOC saint-nectaire.

Les quelques exemples ci-dessus montrent que les flores microbiennes interviennent dans les qualités des produits. Il reste à préci-

ser le lien entre la dynamique de la diversité microbienne structurale et fonctionnelle du lait jusqu'aux fromages affinés et les caractéristiques sensorielles et sanitaires des fromages. Cet objectif ne pourra être atteint que si nous sommes capables d'évaluer cette diversité microbienne aussi bien en terme de composition que d'activités.

Evaluation de la diversité microbienne

Pour définir et comprendre les mécanismes de formation de la diversité sensorielle des fromages, il importe de décrire la diversité microbienne tout au long de la fabrication et de l'affinage et surtout de préciser les activités des flores. La vision que nous avons de la diversité microbienne dans les laits et les fromages est étroitement dépendante des méthodes mises en œuvre pour la mesurer.

La majorité de nos connaissances actuelles sur la diversité microbienne dérive d'une approche de microbiologie classique reposant sur la quantification de flores par dénombrement sur milieux plus ou moins sélectifs, suivie de l'identification phénotypique et génomique d'isolats. C'est ainsi que la population microbienne interne de quelques fromages au lait cru à la flore complexe a été décrite, montrant que de nombreux groupes microbiens sont présents simultanément dans la pâte ou sur la croûte des fromages (bactéries lactiques, bactéries propioniques, bactéries corynéformes, *Staphylococcus* non pathogènes, levures et moisissures). La dynamique de toutes les espèces au cours de l'affinage est loin d'être connue, aussi est-il souvent difficile de parfaitement la corréler aux caractéristiques sensorielles des fromages.

Dans beaucoup d'études, l'identification des flores des fromages s'est souvent focalisée sur les bactéries lactiques, groupe microbien plus facilement cultivable et identifiable que des bactéries non lactiques telles que les bactéries corynéformes se développant en surface de fromage (Irlinger 2000). Les méthodes génomiques de typage des souches ont aussi été surtout appliquées aux espèces de bactéries lactiques, permettant ainsi de dévoiler leur diversité non seulement en termes d'espèces mais aussi de souches. Berthier *et al* (2001) ont ainsi mis en évidence la dominance de *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus rhamnosus* dans les fromages Comté et révélé la diversité génomique de l'espèce *L. paracasei* isolée de deux Comtés de "crus" différents se distinguant par leurs goûts différents. L'hétérogénéité de profils génomiques de *Streptococcus thermophilus* permet de distinguer les souches en fonction du type de fromages dans lesquels elles ont été isolées (Andrighetto *et al* 2002). La diversité génomique de *Lactococcus lactis ssp. lactis* a permis d'associer certaines souches à certains élevages (Corroler *et al* 1998).

La composition de la communauté microbienne est ainsi établie par un assemblage des

souches microbiennes que nous réussissons à cultiver et à identifier. L'image de la population microbienne peut être déformée par l'étape de mise en culture des microorganismes. Elle permet difficilement la comparaison des fromages car le puzzle est plus ou moins facile à constituer et les moyens mis en œuvre plus ou moins importants.

L'approche plus globale visant à décrire l'écosystème dans son ensemble et en s'affranchissant de la culture des microorganismes est aujourd'hui envisageable par l'application de méthodes moléculaires directes. Celles-ci sont le plus souvent basées sur l'analyse des séquences d'acides nucléiques, signatures des microorganismes. Elles ont révélé toute leur pertinence dans d'autres écosystèmes tels que le sol, l'eau et les systèmes de dépollution, mais elles n'en sont qu'à leurs balbutiements dans l'écologie microbienne des fromages. Des techniques telles que la Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ou Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) (Coppola *et al* 2001, Ogier *et al* 2002) commencent à apporter une autre vision des écosystèmes des fromages. Par exemple par clonage - séquençage de banques d'ADN16s et SSCP-PCR, des espèces de bactéries corynéformes (*Brachybacterium*, *Arthrobacter*) ont pu être mises en évidence dans un caillé de fromages d'AOC Salers (Duthoit *et al* 2003). En appliquant la technique SSCP à différents stades d'affinage, des profils microbiens spécifiques de chaque production fermière de fromages Salers ont pu être obtenus (figure 2).

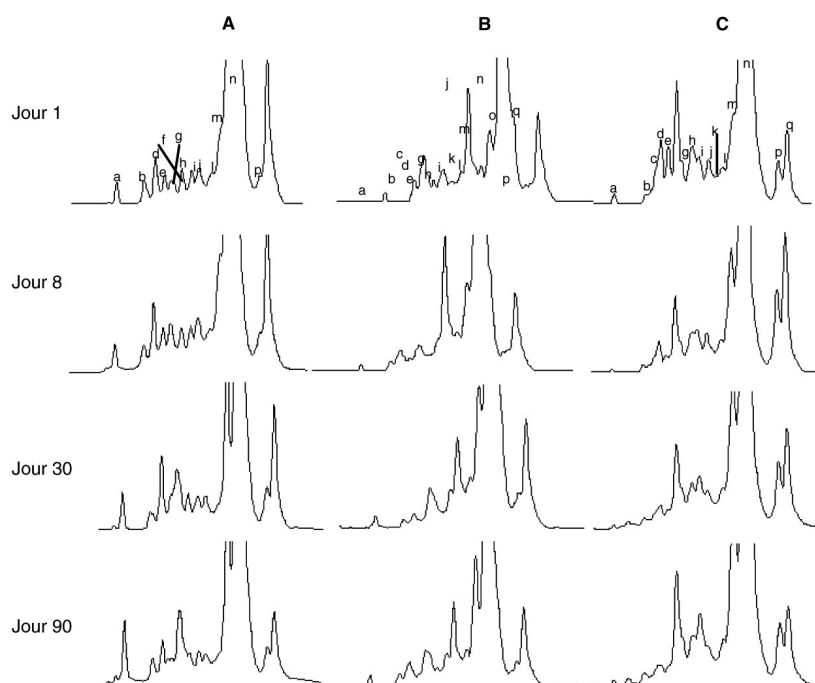
Lien entre diversité microbienne des laits et pratiques d'élevage

La diversité microbienne rencontrée à cœur et en surface des fromages naît de la diversité des flores dans les laits en relation avec la diversité des environnements d'élevage et la diversité des contaminations lors de la fabrication et de l'affinage. La contamination microbienne initiale du lait est évidemment une étape-clé de la transformation fromagère, mais l'évolution des communautés et leurs activités au cours de la fabrication et de l'affinage devraient être mieux intégrées pour définir ce que peut être la "bonne diversité microbienne" d'une flore de lait. En effet, pour un lait de composition microbienne donnée, l'évolution de ces communautés pourra être différente selon la technologie appliquée. A titre d'exemple, dans la technologie des pâtes pressées cuites, les équilibres microbiens du lait sont très rapidement perturbés par le chauffage du caillé en cuve, ainsi que par l'acidification sous presse lui succédant dans la fabrication, alors qu'ils ne le sont pas dans les pâtes pressées non cuites. Mais d'autres facteurs tels que la vitesse d'acidification, le salage ou non du caillé, la taille des fromages, etc, peuvent modifier ces équilibres. Par conséquent, la flore à préserver peut varier d'une technologie fromagère à l'autre. Par ailleurs, la définition de la "bonne diversité" du lait est complexe et pourrait se décliner au pluriel car des fonctionnalités

multiples peuvent être attendues de cette flore : assurer la diversité sensorielle, garantir la qualité sanitaire, conférer aux fromages une valeur santé ...

Quelle que soit la destinée du lait pour des fabrications fromagères, actuellement la "bonne" qualité microbiologique d'un lait est le plus souvent estimée sur la base de deux critères. Le premier se rapporte aux normes concernant les espèces pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*), le second concerne le niveau de flore totale qui doit être le plus faible possible. Le premier critère ne peut être contesté même si les seuils de tolérance peuvent être redéfinis. En revanche, les conséquences du second doivent être réfléchies car des laits faiblement chargés en flore totale ont des capacités fromagères souvent médiocres. Des normes sur la flore totale s'étaient imposées il y a quelques années pour éviter la présence de pathogènes ou d'altération en quantité trop importante dans les laits à flore totale très élevée. En 2003, la plupart des laits destinés à la transformation fromagère ont une charge microbienne inférieure à 10 000 germes totaux/ml. Il convient de s'interroger sur la pertinence d'un seuil sur les germes totaux qui ne prend pas en compte les équilibres microbiens de ces laits. Comme mentionné précédemment, les connaissances que nous avons de ces équilibres microbiens sont souvent issues de dénombrements des grands groupes microbiens et de leur identification souvent sommaire. Ces premières données sur ces équilibres ont montré que pour un niveau de flore globale donné, l'équilibre entre flores dites d'intérêt technologique et celles dites d'altération peut être très différent d'une pro-

Figure 2. Dynamique d'évolution des populations bactériennes dans 3 fromages (A, B, C) d'AOC Salers mesurée par analyse SSCP de l'ADN (d'après Duthoit *et al* 2003).



duction laitière à l'autre. Cet équilibre varie en fonction des pratiques de production du lait (nature du troupeau, propreté des animaux), des conditions de traite et des pratiques de nettoyage (Michel *et al* 2001). De plus, une faible charge microbienne dans le lait ne garantit pas sa qualité sanitaire. A l'avenir, il serait souhaitable d'avoir une description plus fine de la diversité microbienne de la flore des laits. C'est dans ce sens que diverses études régionales⁽¹⁾ sont menées. Il serait alors possible de répondre à un certain nombre de questions en suspens, en particulier si la réduction de la charge microbienne affecte ou non leur composition qualitative.

Des données plus fines sur le lien entre pratiques et flores des laits permettraient de préconiser les pratiques à mettre en œuvre pour préserver la "bonne" diversité microbienne et pour agir avec plus de discernement sur l'élimination des flores indésirables. A l'heure actuelle, la majorité des guides de bonne pratique concerne uni-

quement la réduction de la contamination par les bactéries pathogènes.

Conclusions

Les nouvelles méthodes permettant d'avoir une vision dynamique de l'évolution des populations bactériennes vont apporter une révolution en microbiologie. Une autre révolution devrait suivre concernant notre vision des microorganismes dans le domaine des fromages au lait cru. La meilleure connaissance du comportement des microorganismes dès l'environnement d'élevage, puis dans le lait et, enfin, lors de la fabrication et de l'affinage des fromages devrait permettre d'éviter leur élimination systématique et sans discernement par traitement thermique ou physique du lait. Des stratégies d'action plus rationnelles, maintenant la diversité microbienne souhaitée, pourraient alors être mises en place très en amont dans les filières fromagères et tout au long de l'affinage.

Références

- Andrighetto C., Borney F., Barmaz A., Stefanon B., Lombardi A., 2002. Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *International Dairy Journal*, 12, 141-144.
- Berthier F., Beuvier E., Dasen A., Grappin R., 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal*, 11, 293-305.
- Beuvier E., Berthaud K., Cegarra S., Dasen A., Pochet S., Buchin S., Duboz G., 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized and microfiltered milk. *International Dairy Journal*, 7, 311-323.
- Brouillaud-Delattre A., Maire M., Collette C., Mattei C., Lahellec C., 1997. Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 80, 913-919.
- Buchin S., Delague V., Duboz G., Berdague J.-L., Beuvier E., Pochet S., Grappin R., 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 3097-3108.
- Coppola S., Blaiotta G., Ercolini D., Moschetti G., 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 414-420.
- Corroler D., Mangin I., Desmases N., Gueguen M., 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4729-4735.
- Demarigny Y., Beuvier E., Buchin S., Pochet S., Grappin R., 1997. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait*, 77, 151-167.
- Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C., 2003. Bacterial community dynamics during production of "Registered Designation of Origin" Salers cheese as evaluated by 16S rDNA SSCP analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3840-3848.
- Eppert I., Valdes-Stauber N., Gotz H., Busse M., Scherer S., 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4812-4817.
- Grappin R., Beuvier E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 751-761.
- Irlinger F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surfaces des fromages. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, 172 p.
- Michel V., Hauwuy A., Chamba J.F., 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait*, 81, 575-592.
- Ogier J.C., Son O., Gruss A., Tailliez P., Delacroix-Buchet A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3691-3701.
- Rehman S.U., McSweeney P.L.H., Banks J.M., Brechany E.Y., Muir D.D., Fox P.F., 2000. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10, 33-44.

⁽¹⁾ 1 - « Relations entre les facteurs amont de production des laits et la diversité de la flore microbienne des laits à Comté ». Programme régional - Comité Interprofessionnel du Comité (porteur du projet)-INRA (2002-2005). Autres partenaires : Syndicats du Contrôle Laitier des départements du Jura, du Doubs et de l'Ain, Laboratoire d'Analyses Alimentaires et de Recherche Fromagère de Mamirolle (LARF-ITFF), Comité Technique du Comté.

2 - « Facteurs de maîtrise de *Staphylococcus aureus* et de la flore microbienne des laits crus ». GIS Alpes du Nord, Pôle Fromager AOC Massif Central (INRA- Theix, Aurillac, Poligny / ITFF et partenaires économiques et professionnels)