

## Pour un meilleur contrôle des aptitudes technologiques du lait de fromagerie grâce au développement de méthodes moléculaires du suivi et de la quantification de l'activité microbiologique

Durée : 07/2004 – 06/2007

### Résumé

Le présent projet vise à apporter des réponses aux préoccupations des consommateurs, aux besoins de l'industrie et aux exigences réglementaires en matière de qualité microbiologique du lait et des produits laitiers. Le premier objectif du projet était d'évaluer des méthodes de contrôle permettant de prévenir la dégradation de l'aptitude technologique du lait. Les résultats démontrent que le traitement du lait au dioxyde de carbone ou par la microfiltration peut être utilisé efficacement pour conserver du lait cru pendant 9 jours à 4 °C. Les fromages produits avec ces laits traités après 9 jours de conservation étaient de qualité comparable à ceux produits avec du lait frais de 2 jours. Le deuxième objectif de ce projet était de mettre au point des méthodes moléculaires afin d'étudier l'écologie microbienne des laits avant et après l'application des traitements. Les méthodes ont permis de déterminer la dynamique et la composition en espèces microbiennes (appelé le microbiote) du lait, sans culture ni isolement préalable des bactéries. Le troisième objectif du projet était de développer une méthode pour détecter des déviations dans le comportement des ferments lors de la transformation du lait. Lors du procédé de fabrication fromagère, la méthode a permis de déterminer la contribution relative de chacune des trois souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* à l'association en culture mixte et de suivre la modification de l'activité des ferments selon le traitement. Les connaissances et les techniques sont ainsi disponibles afin d'améliorer la rentabilité de la production et de la transformation en permettant d'augmenter le temps de conservation du lait cru avant sa transformation et en identifiant les facteurs de risque qui peuvent compromettre sa qualité.

### Objectifs et méthodologie

1. Procédures pour prévenir la dégradation de l'aptitude technologique du lait durant la conservation. Dans le but de contrôler la croissance des bactéries d'altération et la présence des cellules somatiques dans le lait cru, trois traitements ont été évalués et comparés à un lait cru non traité : l'ajout de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), la thermisation (chauffage à 65 °C, 16 sec.) et la microfiltration. Les laits ont été conservés à 4 et 8 °C pendant 7 jours (échantillons pris après 1, 3 et 7 jours). La production, la composition et les propriétés sensorielles de fromages Cheddar produits à partir de trois types de laits (cru, microfiltré et acidifié au CO<sub>2</sub>) pasteurisés, à deux temps de conservation (2 et 9 jours) ont été analysées sur six mois.
2. Méthodes moléculaires pour l'analyse du microbiote du lait cru et traité. Pour la méthode T-RFLP (analyse des fragments de restriction terminaux), les produits amplifiés du gène ARNr 16S, marqués au fluorophore, sont digérés et les fragments sont séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur. Pour la méthode DGGE (électrophorèse sur gel de gradient dénaturant), les produits amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient dénaturant avec l'urée.
3. Surveillance moléculaire de l'activité des ferments du lait. La méthode RAP-PCR fournit un profil de l'expression des gènes de toute cellule intacte du ferment dans un échantillon de lait. Les produits amplifiés des ARNm transcrits sont ensuite séparés sur le séquenceur pour donner des profils de pics.

### Résultats et applications

#### 1. Nouvelles connaissances :

1.1 La microfiltration est le procédé le plus efficace, permettant de réduire toutes les populations microbiennes, les spores et les cellules somatiques. La thermisation n'a permis de réduire les populations microbiennes que d'environ 1 Log. L'ajout de CO<sub>2</sub> n'a pas permis de réduire le nombre, mais sa présence empêche le développement microbien pendant l'entreposage du lait à 4 °C. La qualité du lait traité est donc prolongée comparativement au lait cru. Après 7 jours d'entreposage à 4 °C, les traitements de conservation évalués n'ont eu aucun effet significatif sur les propriétés physicochimiques et

technologiques des laits traités. L'ajout de CO<sub>2</sub> et la microfiltration sont donc efficaces pour maintenir la qualité et les propriétés technologiques du lait entreposé à 4 °C. Aucune différence significative n'a été observée sur la composition et le rendement des fromages obtenus, ainsi que l'évolution des lactocoques durant l'affinage, les propriétés physicochimiques, la fermeté et l'analyse sensorielle. La prolongation de la conservation des laits de fromagerie jusqu'à 9 jours n'a pas eu d'effet sur la composition et la diversité des communautés bactériennes tout au long de l'affinage.

## Résultats et applications - suite...

1.2 La méthode T-RFLP a permis de différencier la communauté microbienne selon le traitement appliqué, le temps et la température d'entreposage des laits. La banque de clones d'ADNr 16S a confirmé ces résultats. L'efficacité de la thermisation est observée par l'absence ou la faible intensité des pics T-RFLP associés aux bactéries d'altération. Le profil DGGE démontre des bandes correspondant aux bactéries d'altération dans le lait contrôle et CO<sub>2</sub>, mais pas dans le lait thermisé. Ainsi, les profils de DGGE permettent de révéler l'effet des traitements sur la communauté microbienne du lait et permettent également de déterminer les bactéries dominantes dans le lait.

1.3 La technique RAP-PCR (RNA Arbitrarily Primed PCR) fluorescente a permis de révéler la variation de l'expression des gènes d'un ferment laitier composé de trois souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* selon le type de lait, le traitement thermique ou par CO<sub>2</sub>, les

paramètres de fermentation, et la préparation du ferment. La technique distingue la contribution de chacune des souches à l'activité totale du ferment, ce qui ne peut pas être démontré par les méthodes microbiologiques.

### 2. Applications :

Les traitements permettent de maintenir la qualité et l'aptitude technologique du lait lors de la conservation, pour éviter des pertes lors des périodes d'arrêt de production. La technique T-RFLP permet de mesurer la qualité microbiologique du lait sans culture ni isolement préalable des bactéries. La technique RAP-PCR permet de repérer des déviations de la fermentation du lait à la suite de modifications des procédés, et de comprendre l'effet des paramètres sur l'activité des ferments.

## Transfert des résultats

Des présentations auprès des secteurs industriel et académique ont été effectuées pour faire connaître les résultats du projet et des articles sont en cours de rédaction pour informer la communauté scientifique.

## Partenaires financiers

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies

Novalait inc.

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Agriculture et Agroalimentaire Canada

**BUDGET TOTAL : 375 000 \$**

## Point de contact

### Responsable du projet :

**Gisèle LaPointe**

Université Laval

Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF)

Centre de recherche en sciences et technologie du lait

(Centre STELA)

2440 boul. Hochelaga

Québec (Québec) G1V 0A6

Téléphone : (418) 656-2131 poste 3100

Télécopieur : (418) 656-3353

Courriel : gisele.lapointe@fsaa.ulaval.ca

### Collaborateurs :

**Denis Roy**, Université Laval

**Daniel St-Gelais**, Agriculture et Agroalimentaire Canada



2750, rue Einstein, bureau 220-A, Québec (Québec) G1P 4R1  
Tél. : (418) 527-7947 • Téléc. : (419) 527-5957  
novalait@novalait.ca • www.novalait.ca