



**HAL**  
open science

# Impact de la fréquence des repiquages sur la stabilité du levain utilisé pour la fabrication d'un lait fermenté traditionnel, le Gwell

Yu Xiao Xu

► **To cite this version:**

Yu Xiao Xu. Impact de la fréquence des repiquages sur la stabilité du levain utilisé pour la fabrication d'un lait fermenté traditionnel, le Gwell. Microbiologie et Parasitologie. 2020. hal-02790188

**HAL Id: hal-02790188**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02790188v1>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## RAPPORT DE STAGE

# Impact de la fréquence des repiquages sur la stabilité du levain utilisé pour la fabrication d'un lait fermenté traditionnel, le Gwell®



**Yu-Xiao XU**

Stage assistant ingénieur

Septembre 2019 - Février 2020

Tuteur entreprise : Mme Florence VALENCE-BERTEL & M. Lucas VON GASTROW

Enseignant suiveur : Mme Sandrine MORANDAT

Établissement : Université de Technologie de Compiègne

Entreprise d'accueil : Unité Mixte de Recherche - Science et Technologie du Lait et de l'Œuf

# Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps, ma tutrice, Mme Florence VALENCE-BERTEL, responsable de l'équipe CIRM-BIA, pour ses conseils de l'organisation des manipulations, de l'interprétation des résultats ainsi que pour l'indépendance et la confiance accordée pendant mon stage. Je remercie également Marie-Noëlle MADEC, IE du groupe CIRM-BIA, pour son partage de ses connaissances de bactéries présentant souvent dans produits laitiers fermentés, surtout lorsque nous avons rencontré des colonies ayant la morphologie non prévue.

Un grand merci à Lucas von Gastrow, le doctorant qui a apporté ce sujet, avec lui j'ai visité les fermes et effectué les manipulations. Il m'a accompagné tout au long de cette période de stage, sachant répondre à mes interrogations, me guider dans les analyses des résultats, et dans la rédaction de ce rapport.

Mes remerciements vont aussi à Violaine, Elise et Marion, les éleveurs et éleveuses, pour nous avoir accueilli dans leur ferme, pour le temps qu'ils ont effectué les repiquages intermédiaires, pour nos échanges et les bons repas !

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous les membres du STLO qui m'ont aidé lors de mon stage : Victoria, Anne-Sophie, Jessica, Sébastien, Anne, Sylvie, Laurence, Danielle, ainsi que Wenfan, Xiaoxi et Léa qui ont promu mon intégration dans l'équipe.

Enfin, je remercie Martine YVINEC, coordinatrice des stages pour son soutien administratif et Sandrine MORANDAT, enseignant suiveur pour son soutien pédagogique et ses conseils et la relecture de ce rapport.

# Sommaire

1	Introduction.....	5
1.1	Présentation de l'entreprise .....	5
1.2	Contexte du sujet .....	7
2	Matériel et méthodes .....	10
2.1	Modalités de prélèvement et caractéristiques des 3 fermes fournissant les Gwell pour l'étude .....	10
2.2	Méthodologie expérimentale .....	12
2.3	Mise en place du protocole de recherche .....	12
2.3.1	Fabrication et prélèvements des échantillons de Gwell.....	12
2.3.2	Identification des échantillons.....	13
2.3.3	Suivi du pH en continu.....	14
2.3.4	Dénombrement.....	14
2.3.5	Isolement des souches et conservation.....	15
2.3.6	Centrifugation pour l'analyse ultérieure d'attaque par des bacteriophages .....	15
2.3.7	Conservations des échantillons .....	15
2.3.8	Analyses physicochimiques du lait .....	16
3	Résultats et discussion .....	17
3.1	Suivi du pH.....	17
3.2	Résultats de dénombrement .....	18
3.3	Variation de proportion des différentes espèces en réponse aux variations de la fréquence de repiquage .....	21
3.4	Lien entre la proportion des différentes espèces et la vitesse d'acidification	23
3.5	Sélection différentielle des différentes espèces en fonction des changements d'environnement – passage à 30 et 4°C.....	25
3.6	Impact de la composition du lait.....	25
4	Conclusions et perspectives.....	27

# Liste des acronymes

**CIRM-BIA** : Centre International de Ressources Microbiennes - Bactéries d'Intérêt Alimentaire

**GIS** : Groupement d'Intérêt Scientifique

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**INRAe** : Institut National de Recherche Agronomique et de l'environnement

**IRSTEA** : Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

**UMR STLO** : Unité Mixte de Recherche Science et Technologie du Lait et de l'Œuf

# Liste des figures et tableaux

**Figure 1** : Organisation de l'URM STLO, équipes thématiques, d'appui et plateformes ..... 6

**Figure 2** : Principales étapes de la fabrication du Gwell..... 8

**Figure 3** : Schéma expérimental de suivi sur 4 semaines des deux fréquences de repiquage ..... 11

**Figure 4** : Analyses réalisées sur les échantillons de Gwell ..... 12

**Figure 5** : Courbes d'acidification et suivi de température pendant la fermentation correspondante. .... 18

**Figure 6** : Résultats des dénombrements pour les séries 1/semaine, 3/semaine et S0.4..... 19

**Figure 7** : Évolution des moisissures au cours de la fermentation et de la conservation chez Henry..... 21

**Figure 8** : Évolution de la proportion des bactéries citrate négatives (ration sous-espèces *cremoris* / *lactis*)..... 22

**Figure 9** : Suivi d'acidification du lait par les souches pures et associations des souches..... 23

**Figure 10** : Relation entre la proportion de lactocoques citrate négatives (*cremoris* / *lactis*) et la vitesse maximale d'acidification. .... 24

**Figure 11** : Lien entre la quantité de matière azotée totale du lait et la proportion de lactocoques citrate négatives (*cremoris* / *lactis*)..... 26

**Tableau 1** : Informations sur les 3 fermes fournissant le Gwell pour l'étude..... 10

**Tableau 2** : Liste des milieux de culture et des conditions d'incubation utilisées..... 14

# Résumé Technique

Le Gwell aussi appelé « gros-lait », est un lait fermenté issu de la tradition culinaire bretonne, produit à partir de lait de vaches locales bretonnes : Froment du Léon, Armoricaïne, Nantaise et surtout la race Bretonne Pie Noir. Il est produit par repiquage, c'est-à-dire qu'on l'obtient en ensemençant du lait avec du Gwell de la production précédente, qui sert alors de ferment. Le repiquage ne donne parfois pas lieu à une acidification suffisante, le Gwell est alors dit « perdu ». La seule solution pour le producteur est d'obtenir un nouveau Gwell chez un collègue. L'Union Bretonne Pie Noir qui détient la marque Gwell a pris part à un projet européen soutenant la valorisation des produits issus de races locales. Un volet du projet visait à sécuriser la production de Gwell en identifiant les facteurs potentiellement à l'origine de la perte du ferment.

Mon stage s'inscrivait dans la continuité du projet précédemment cité dans le cadre duquel on a montré que l'écosystème bactérien du Gwell reposait sur un équilibre entre 2 sous espèces de bactéries lactiques majoritaires : *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* sp. *lactis* et que des repiquages trop rapprochés pourraient être responsables de la perte du ferment. Le sujet de mon stage visait donc à étudier l'impact de la fréquence des repiquages sur la stabilité du levain Gwell. Ce sujet a été conduit en étroite collaboration avec Lucas Von Gastrow, un doctorant, au sein de l'équipe CIRM-BIA, un centre de ressources biologiques de l'INRAe dédié aux bactéries d'intérêt alimentaires.

Pour ce faire, en concertation avec 3 producteurs de Gwell, sélectionnés sur la base de résultats antérieurs, deux fréquences de repiquage ont été étudiées : soit un repiquage toutes les semaines, soit un repiquage 3 fois par semaine. Sachant qu'entre 2 repiquages le Gwell est conservé à 4°C et que la fermentation est conduite à 30°C, pour prendre en compte l'environnement varié pendant la fabrication et la conservation, deux contrôles respectivement à 30 et 4°C ont été inclus dans notre suivi. L'analyse de la stabilité du ferment Gwell était évaluée sur sa capacité acidifiante (suivi cinétique du pH pendant la fabrication) et sur l'analyse microbiologique du Gwell résultats (dénombrement).

Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence que la fréquence de repiquage a un effet direct sur l'équilibre entre les 2 sous espèces de *Lactococcus* : *lactis* et *cremoris*, le repiquage fréquent du Gwell étant responsable d'une augmentation de *cremoris* au détriment de *lactis*. La variation environnementale temporelle (passage successifs à 30 et 4°C) permet le maintien de l'équilibre entre *lactis* et *cremoris* mais la conservation sur une longue durée sans repiquage conduit au déséquilibre du ferment et est responsable d'une diminution de la population de la sous-espèce *lactis* avec en parallèle une augmentation du nombre de levures.

# 1 Introduction

Les produits fermentés font partie de notre alimentation depuis des millénaires. Selon les pays, ils représentent de 10 à 40% de l'alimentation, avec des produits emblématiques des cultures alimentaires locales (nationales ou régionales). Parmi ces derniers, les produits laitiers fermentés représentent un exemple emblématique de la culture alimentaire française (Tamang et al, 2010). Mon sujet portait sur un produit laitier fermenté traditionnel, originaire de Bretagne, le Gwell.

J'ai effectué, du 2 septembre 2019 au 14 février 2020, un stage de 6 mois au sein de l'UMR STLO du Centre de Recherche Bretagne-Normandie (situé à Rennes) sur le sujet « Impact de la fréquence des repiquages sur la stabilité du levain utilisé pour la fabrication d'un lait fermenté traditionnel, le Gwell ».

Ce rapport, après une présentation de l'entreprise en première partie, explicitera ce qu'est le Gwell et les études antérieures qui ont été réalisées sur ce produit avant mon arrivée. Il détaillera ensuite la problématique à laquelle je devais répondre ainsi que l'approche adoptée et les résultats obtenus lors de mon stage. Enfin, des perspectives et des expérimentations complémentaires qui pourraient être envisagées seront proposées.

## 1.1 Présentation de l'entreprise

L'organisme d'accueil de mon stage est l'INRA – Centre INRA Bretagne Normandie. C'est un des dix-huit centres de recherche de l'INRA (maintenant l'INRAe, suite à la fusion de l'INRA et l'IRSTEA depuis 1er janvier 2020). L'INRAe est le premier institut de recherche au monde à caractère spécialisé sur les domaines interdépendants de l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (<https://www.inrae.fr/>). Il est axé sur le développement de systèmes de production durables et résilients face aux aléas économiques et environnementaux, garantissant une alimentation saine et un environnement préservé. L'essentiel des activités de l'INRAe en Bretagne se déploie en Ille-et-Vilaine, et plus particulièrement dans l'agglomération rennaise qui héberge 85% des effectifs. L'UMR STLO, où j'ai effectué mon stage, en est une des unités de recherche.

En tant qu'unité mixte de recherche regroupant des personnels INRAe et des enseignants chercheurs d'Agrocampus Ouest, l'UMR STLO (<https://www6.rennes.inrae.fr/stlo>) dispose de compétences en recherche, mais aussi dans l'enseignement supérieur et la formation continue. Elle a quatre missions principales : développer une expertise publique sur les composants du lait et de l'œuf en explorant leur structure, leurs multiples fonctionnalités, leur digestibilité, qu'ils soient natifs ou soumis à divers procédés ; augmenter la qualité et la sécurité des produits laitiers fermentés et des ovoproduits par la connaissance de l'expression in situ des bactéries, la préservation et l'exploration de leur biodiversité ; former des étudiants de master et de doctorat et favoriser leur insertion dans la recherche,

l'enseignement ; faire bénéficier la société et l'industrie des nouvelles avancées scientifiques au travers d'un partenariat régulier et diversifié. Elle regroupe 83 permanents dont 34 scientifiques, 25 doctorants, environ 10 masters et 3 à 5 post-doctorants. Elle tisse un réseau dense de collaborations nationales et internationales. Au niveau international, l'UMR STLO collabore avec une cinquantaine de partenaires de renom établis dans plus de 28 pays pour améliorer la portée scientifique de ses travaux.

L'UMR STLO est découpée en cinq équipes thématiques de recherche qui travaillent en étroite collaboration : ISF-PL (Interactions Structures Fonctionnalités des Protéines et des Lipides) ; BN (Bioactivité et Nutrition) ; SMCF (Séchage, Matrice, Concentration, Fonctionnalités) ; PSM (Procédés de Séparation par Membrane) et MICROBIO. Elles offrent un panel complet d'expertises en biochimie, physico-chimie, procédés et microbiologie, permettant des approches pluridisciplinaires des questions de recherche. Deux plateformes certifiées ISO9001:2015 sont au cœur de son dispositif : La Plateforme Lait et le centre de ressources biologiques CIRM-BIA. La première est dédiée au lait et à ses multiples transformations ; la deuxième est consacrée à la préservation et à l'exploitation de la biodiversité des bactéries alimentaires. La vie quotidienne au sein de l'unité, les questions administratives, la maintenance informatique, la documentation... sont facilitées par l'équipes d'appui SAPHIRE. C'est au sein du centre de ressources biologiques que s'est déroulé mon stage.

**Figure 1 : Organisation de l'URM STLO, équipes thématiques, d'appui et plateformes**



Créé en 2004, le CIRM est un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) géré par l'INRA. Il est constitué de 5 centres de ressources microbiennes, chacun étant spécialisé dans un type de microorganisme : les champignons filamenteux à Marseille, les levures à Jouy-en-Josas, les bactéries pathogènes à Tours, les bactéries associées aux plantes à Angers, et enfin les bactéries d'intérêt alimentaire à Rennes. Sa mission est d'acquérir, identifier, préserver et diffuser les souches de



microorganismes à la communauté scientifique internationale, autant académique qu'industrielle.

Le CIRM-BIA est entré en activité le 1er septembre 2006. C'est un centre de ressources biologiques spécifiquement dédié aux bactéries d'intérêt alimentaire (fabrication d'aliments fermentés et bio-préservation). Ses collections regroupent plus de 4000 souches appartenant à 30 genres et 150 espèces différentes. Ce nombre est en constante augmentation par le biais de collectes ciblées dans des biotopes variés. Ces souches sont sélectionnées de manière à offrir la plus grande diversité possible, tant du point de vue taxonomique que du point de vue fonctionnel. Il est hébergé dans les locaux de l'UMR STLO.

L'activité de recherche du CIRM-BIA est centrée sur la caractérisation et la compréhension de la diversité inter- et intra-spécifique de bactéries d'intérêt alimentaire à des fins d'innovation. Il propose également des prestations de service en lien avec la préservation, l'identification et la caractérisation des souches de bactéries d'intérêt alimentaire, la caractérisation d'écosystèmes alimentaires ou encore le ciblage haut débit d'activités spécifiques. (Source : plaquette CIRM 2018, <https://www6.inrae.fr/cirm/Bacteries-d-Interet-Alimentaire>) L'équipe du CIRM-BIA est constituée de 4 personnes à plein temps pour ses activités de collection, de prestations et de recherche, avec en plus des personnes de l'UMR qui donnent un pourcentage de leur temps à l'activité du CIRM-BIA.

C'est dans les locaux du CIRM-BIA encadré par son personnel que s'est déroulé mon stage, en étroite collaboration avec un doctorant (Lucas Von Gastrow) dont la thèse intitulée « Étude de la stabilité des levains obtenus par la méthode du "back-slopping", une démarche de recherche participative » vise entre autre à mieux comprendre les facteurs qui affectent la stabilité du levain utilisé pour la fabrication d'un lait fermenté traditionnel, le Gwell.

Le sujet de mon stage « Impact de la fréquence des repiquages sur la stabilité du levain utilisé pour la fabrication d'un lait fermenté traditionnel, le Gwell » a été conçu de façon à obtenir des données qui viendraient appuyer les expérimentations envisagées dans le cadre de la thèse de Lucas Von Gastrow.

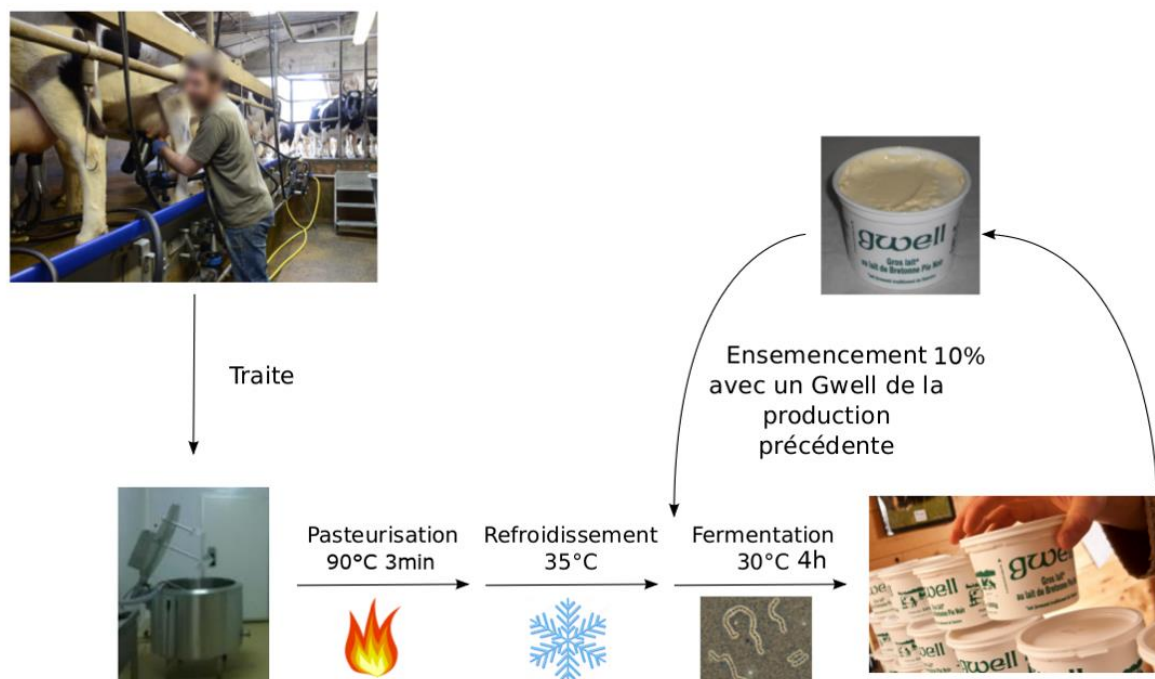
## 1.2 Contexte du sujet

Le produit auquel nous nous sommes intéressés, est le Gwell, également appelé "gros-lait". Le gros-lait est une recette traditionnelle bretonne de lait fermenté à température modérée (30°C). Il peut être consommé comme un dessert à la manière d'un yaourt ou d'un fromage blanc (Leborgne et al. 1998). Il se distingue cependant de ces deux produits par le fait que le yaourt est un lait fermenté à haute température (40 à 45°C) qui ne doit contenir que les espèces de bactéries thermophiles, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, et que le fromage blanc lui est préparé avec des ferments mésophiles auxquels on ajoute de la présure pour faire coaguler le lait avant de l'égoutter (Codex alimentarius, 2011).

Le Gwell, est l'appellation donnée au gros-lait lorsque celui-ci est fabriqué spécifiquement à partir du lait des vaches de race rustique originaire de Bretagne, surtout la race Bretonne Pie Noir (Morinière, 2017). En Breton, Gwell signifie "meilleur", et rappelle également le mot Goell, "le ferment", qui implique que ce produit est obtenu par repiquage (back-slopping en anglais). Autrement dit, le levain utilisé pour l'ensemencement du Gwell est constitué par une fraction de la fabrication précédente. Les caractéristiques du Gwell sont à peu de choses près celles du lait caillé, légèrement visqueux, à la cassure franche, avec sur le dessus une fine couche de crème, d'un goût doux et acidulé et d'une texture ferme et onctueuse.

La fabrication du Gwell nécessite l'utilisation de matériel de fromagerie tel que pasteurisateur (ou faitout/casserole avec plaque chauffante), seau plastique, louche, etc. Le Gwell est préparé à partir du lait entier, pasteurisé entre 85 et 90°C puis refroidi à 30°C, auquel on introduit une fraction (entre 5 et 10%) d'une fabrication précédente de Gwell qui constitue le levain. Après trois à cinq heures de temps de prise en étuve à 30°C environ, il est mis au frais, prêt à être dégusté. Un litre de lait peut donner 1.1 litre de Gwell.

**Figure 2 : Principales étapes de la fabrication du Gwell**



Les éleveurs de Bretonne Pie Noir qui fabriquent le Gwell sont malheureusement parfois confrontés à un problème de "perte" du ferment, qui se caractérise par des fabrications qui coagulent plus lentement ou même qui ne coagulent plus du tout. Sachant que la technique utilisée est le back-slopping, et que les éleveurs ne veulent pas standardiser la production comme cela se fait à l'échelle industrielle en utilisant ferments commerciaux standardisés, la seule solution en cas de perte reste donc pour l'éleveur d'obtenir un nouveau Gwell chez un collègue. Pour essayer d'apporter une

solution à ces éleveurs, un sujet de recherche portant sur la “sécurisation de la production du Gwell” a été initié en 2017 et a bénéficié d’un financement européen. Il visait caractériser la diversité bactérienne du Gwell et à comparer différentes modalités de conservation du ferment ou de souches isolées. À la fin de cette étude, plusieurs hypothèses concernant la perte du ferment ont été émises. Ainsi certains éleveurs pensent que l’alimentation des vaches joue un rôle important dans la viabilité du ferment. Les changements dans l’alimentation liées aux changements de saison occasionneraient un “déséquilibre” dans le lait qui pourrait expliquer la perte du ferment (Bouton et al., 2005). Il est également possible que le Gwell soit perdu à cause d’une mauvaise pasteurisation ou d’une attaque de bactériophages. Enfin de nombreux éleveurs considèrent que le temps entre les repiquages successifs serait un facteur important. Le sujet de thèse du Doctorant Lucas Von Gastrow avec lequel j’ai travaillé dans le cadre de mon stage visait à explorer plus spécifiquement cette dernière hypothèse.

Les principaux résultats obtenus dans le cadre de l’étude précédemment citée et des premiers résultats obtenus par Lucas Von Gastrow montrent que l’écosystème microbiologique du Gwell est systématiquement constitué de deux bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, et de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (ces deux sous espèces apparaîtront des manière simplifiée sous les termes respectif de “*lactis*” et “*cremoris*” dans la suite de rapport) auxquelles peuvent être associées, selon les Gwells considérés, une autre espèce de bactérie lactique, *Streptococcus thermophilus* et une levure *Geotrichum candidum*. Les deux sous espèces de lactocoques, *lactis* et *cremoris*, caractérisées par des métabolismes différents, composent la flore majoritaire du levain Gwell. La sous-espèce *lactis* a un métabolisme actif à 4°C à l’inverse de la sous-espèce *cremoris*. Ainsi nous avons émis l’hypothèse selon laquelle des repiquages rapprochés dans le temps favoriseraient la sous-espèce *cremoris* au détriment de la sous-espèce *lactis*, ce qui pourrait à terme conduire à la dérive et à la perte du ferment.

L’objet de notre étude est donc d’essayer de comprendre les mécanismes à l’origine de la dérive du ferment en s’intéressant notamment à l’évolution et à la stabilité de la communauté microbienne du ferment Gwell en réponse à des perturbations environnementales et en se focalisant sur ces deux sous espèces *lactis* et *cremoris*. Dans ce contexte, les expérimentations envisagées dans le cadre du stage proposé visaient à explorer l’hypothèse selon laquelle la fréquence des repiquages du ferment serait à l’origine des problèmes d’instabilité observée.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Modalités de prélèvement et caractéristiques des 3 fermes fournissant les Gwell pour l'étude

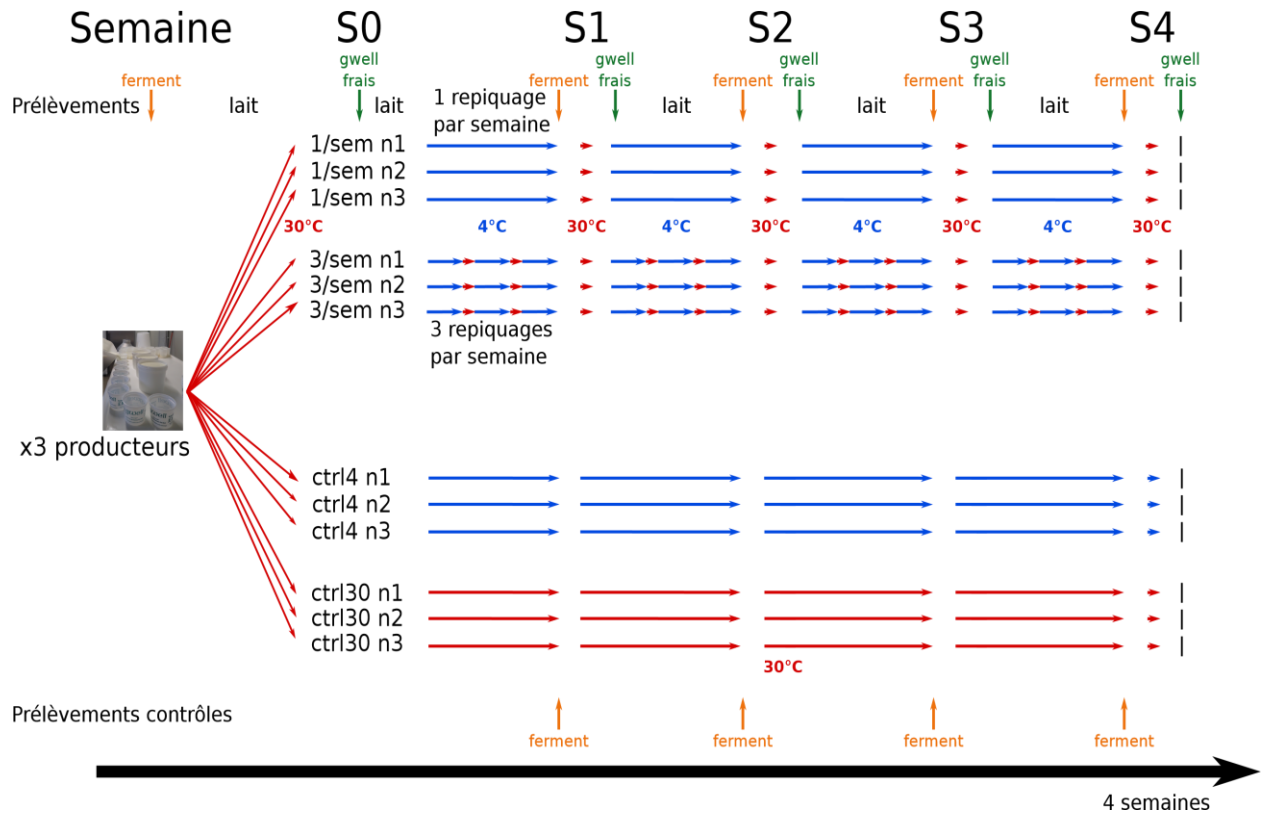
Suite à des réunions avec les éleveurs participant au projet en été 2019, avant le début de mon stage, Lucas avait sélectionné 3 fermes productrices de Gwell sur lesquelles le suivi des levains Gwell allait être réalisé pour évaluer l'influence de deux modes de repiquage différents : un repiquage "fréquent" et un repiquage "long". Les fermes ont été sélectionnées en prenant en compte leur capacité de production de lait autant que leur fréquence de fabrication. Les trois fermes retenues sont présentées ci-dessous.

**Tableau 1 : Informations sur les 3 fermes fournissant le Gwell pour l'étude**

Noms des fermes	Coordinateurs	Localisations géographiques	Caractéristiques	Périodes de prélèvement
GAEC Lait-Au-Champ	MEIGNAN Thomas	Les Vignes 56840 ILE D'ARZ	~30 vaches ; production du Gwell 1/semaine ; ferment à T0 13j	07/10/2019 - 06/11/2019
La ferme du Rhun	CLOZEL Yann- LAUDREN Elise	Runfaouès 22420 LE VIEUX MARCHE	~12 vaches ; production du Gwell 3/semaine ; ferment à T0 3j	21/10/2019 - 18/11/2019
Ferme Le buissonnant	HENRY Marion	Kerleo 22110 PLOUGUERNEVEL	~30 vaches laitières ; production du Gwell 1/semaine ; ferment à T0 7j	13/11/2019 - 11/12/2019

Le schéma expérimental qui illustre les deux modalités de repiquage, "fréquent" et "long" est présenté ci-dessous (figure 3). Puisque le Gwell est fabriqué par back-slopping, ce nom désigne à la fois le produit fini et le ferment utilisé. Pour faciliter la compréhension de ce rapport, nous avons choisi de les distinguer avec des nominations différentes, "Gwell frais" et "ferment" respectivement, dans la suite de nos manipulations. De plus, pour tenir compte des conditions de variabilités entre éleveurs pour la production et la conservation, deux contrôles ont été ajoutés avec un suivi des Gwell maintenus à 30 et 4°C sur toute la durée de l'expérimentation.

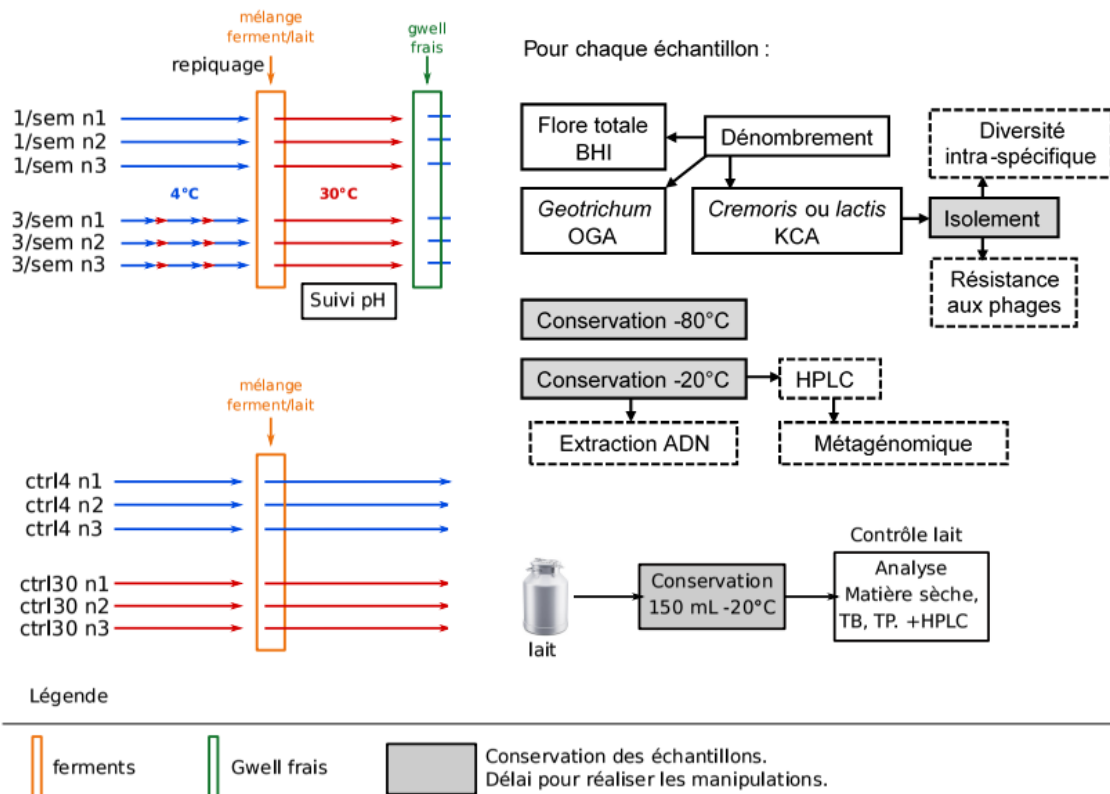
**Figure 3 : Schéma expérimental de suivi sur 4 semaines des deux fréquences de repiquage**



## 2.2 Méthodologie expérimentale

Différents suivis (présentés en figure 4) ont été effectués pour étudier l'impact de la fréquence de repiquage sur l'évolution et la stabilité du ferment Gwell : Suivis de pH ; Analyses microbiologiques des levains et suivi ciblé du rapport entre les deux sous espèces *lactis* et *cremoris* ; Mise en œuvre en parallèle de techniques culture-dépendante et de biologie moléculaire ; Analyse fonctionnelles des ferments, basée sur les cinétiques d'acidification ; Caractéristiques organoleptiques des Gwells produits.

Figure 4 : Analyses réalisées sur les échantillons de Gwell



## 2.3 Mise en place du protocole de recherche

### 2.3.1 Fabrication et prélèvements des échantillons de Gwell

La fabrication du Gwell dans nos expérimentations a été réalisée chez les éleveurs et respecte leurs pratiques, sauf la température de refroidissement du lait qui a été modifiée pour tenir compte du fait que le volume de production dans notre expérimentation était inférieur au volume de production de celui des éleveurs et donc avec une inertie thermique différente. Le Gwell de la production précédente nous servant de ferment était conservé au froid par les éleveurs. Dès que le ferment est ajouté dans le lait thermisé et refroidi à 37°C, la température du mélange baisse rapidement. Quant à la fermentation, même si les éleveurs utilisent des étuves

traiteurs, nous avons nous utilisé des boîtes polystyrène isothermes pour éviter le dérangement de leur production (tomme, yaourt, etc.). La température au sein des boîtes isothermes était maintenue avec deux bouteilles d'eau tiède et une épaisseur de coton. Le temps de fermentation n'est pas fixé. Le Gwell est jugé prêt quand le pH suivi est inférieur à 4,7-4,6 qui est la valeur de pH seuil de la déstabilisation des micelles de caséines et de leur agrégation entraînant la formation du gel lactique aussi appelé "caillé". Compte tenu de l'éloignement des éleveurs et du volumes d'analyses à effectuer au laboratoire, nous nous déplaçons sur les fermes une fois par semaine. Les fabrications intermédiaires de Gwell pour fournir un ferment repiqué 3 fois par semaine étaient effectuées par les éleveurs.

Pour notre analyse, le lait pasteurisé était collecté lorsque nous allions à la ferme. Une partie servait à l'analyse physicochimique du lait et l'autre partie à la préparation du Gwell de contrôle qui était réalisé au labo. Les Gwells frais et les ferments correspondants étaient également prélevés. Tous ces échantillons étaient transportés dans une glacière (boîte polystyrène avec de la glace) et transférés au labo pour effectuer nos analyses.

### 2.3.2 Identification des échantillons

Pour répondre à notre problématique visée, cinq séries de Gwell ont été étudiés. Pour simplifier l'identification des échantillons, les codes suivants ont été utilisés.

<b>1</b>	<b>M</b>	<b>1</b>	<b>S0</b>	<b>F</b>
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

(1) Chiffre permettant d'identifier le traitement appliqué à l'échantillon de Gwell : 0, 1, 3, 4, 30 et S0.4 qui correspondent respectivement aux Gwells initiaux, aux Gwells repiqués 1 fois par semaine, aux Gwells repiqués 3 fois par semaine, aux Gwells contrôlés à 4°C, aux Gwells contrôlés à 30°C et enfin aux Gwells de départ mais conservés au froid pendant la durée totale du suivi (4 semaines).

(2) Lettre permettant d'identifier la ferme d'origine des Gwells (basé sur le nom des éleveurs) : M, L et H.

(3) Numération des replicats. Chaque série ayant fait l'objet de trois replicats pour diminuer l'erreur fortuite.

(4) Numéro de la semaine considérée, noté de S0 à S4.

(5) Type d'échantillon, soit F (Ferment), soit G (Gwell frais).

À titre d'exemple un échantillon noté **3M2S4G** correspond à un échantillon de Gwell (replicat n°2) provenant de la ferme de Monsieur Meignan repiqué 3 fois par semaine et analysé la 4<sup>ème</sup> semaine de l'expérimentation

### 2.3.3 Suivi du pH en continu

Le pH pendant la fermentation a été suivi par iCinac Wireless qui est un instrument multivoies permettant de suivre en temps réel et en continu le pH afin de mesurer l'activité acidifiante des ferments lactiques ainsi que la température des échantillons. Une fois que le ferment et le lait étaient bien mélangés et répartis dans des pots de 500 grammes, les électrodes (préalablement rincées à l'éthanol puis à l'eau distillée) étaient placées dans les pots à travers une ouverture pratiquée dans le couvercle. Les pots étaient ensuite placés dans une boîte polystyrène servant d'étuve. Deux bouteilles d'eau chaude étaient ajoutées pour maintenir la température à 30°C. Un thermobouton était mis dans cette boîte pour vérifier l'évolution de température à l'intérieur. Le logiciel affiche le pH réel et effectue un enregistrement toutes les 5 minutes. Le pH a été suivi pendant environ 4h30 (temps moyen nécessaire pour atteindre pH 4,6).

### 2.3.4 Dénombrement

Les dénombrements ont été réalisés sur les Gwells frais et les ferments. Les échantillons ont été dilués 10 fois dans de l'eau citratée (concentration de Citrate Trisodique 20 g/L) préalablement réchauffée à 48°C. Cette dilution a été placée dans un sac à filtre (bagpage+ Interscience) pour homogénéiser l'échantillon. Des dilutions en série (jusqu'à 10<sup>-6</sup>) ont été réalisées dans l'eau tryptonée (tryptone 1 g/L, Chlorure de sodium 8.5 g/L). 100 µL de solution a été étalée sur chaque boîte de Pétri grâce à un enseigneur Easy spiral pro Interscience. Les boîtes de Pétri étaient incubées dans une étuve dont la température et le temps d'incubation dépendaient des milieux utilisés qui sont résumés dans le tableau 2.3.4. Une fois les colonies développées, les boîtes contenant 30 à 300 colonies ont été comptées manuellement à l'aide d'un stylo compteur ou un compteur manuel de colonies Scan® 10.

**Tableau 2 : Liste des milieux de culture et des conditions d'incubation utilisées**

Nom du milieu	Microorganisme correspondant	Conditions d'incubation	Référence
BHIYEA (Bouillon Cœur-Cervelle Agar)	Dénombrement et l'isolement des bactéries exigeants et difficilement cultivables sur d'autres milieux	Aérobiose 1-2 jours 30°C	EN-ACT-14
OGA (Base Oxytétracycline Glucose Agar + chloramphénicol)	Dénombrement sélectif des levures et moisissures	Aérobiose 1-2 jours 25°C	EN-ACT-122
KCA (Calcium Citrate Agar)	Milieu sélectif permettant de cultiver les lactocoques, et de les distinguer selon leur capacité à métaboliser le citrate ( <i>lactis</i> ) qui se traduit par l'apparition d'un halo translucide autour de la colonie	Aérobiose 2 jours à 30°C, puis 4-6 jours à température ambiante	EN-ACT-102
VRBL (Violet Red Bile Lactose)	Milieu sélectif pour le dénombrement des bactéries coliformes	Aérobiose 1-2 jours 30°C	VRBL agar : Biokar réf : BK 152 HA



Les dénombrements ont été faits systématiquement sur des milieux BHI, KCA et OGA où des colonies sont ensemencées sur la surface. Une recherche de bactéries coliformes a été effectuée pour vérifier la contamination fécale des échantillons sur milieu VRBL. Dans ce cas, les échantillons sont ensemencés dans la masse.

### **2.3.5 Isolement des souches et conservation**

La distinction préliminaire des deux sous-espèces de lactocoques se base sur l'apparition d'un halo sur milieu KCA pour la sous-espèce *lactis* avec des halos et l'absence de halo pour la sous-espèce *cremoris*. La diversité intra-spécifique et la résistance aux phages des deux sous espèces seront étudiées ultérieurement dans le cadre de la thèse de Lucas. Pour chaque échantillon, 12 colonies avec halos et 12 colonies sans halos ont été systématiquement prélevées sur des boîtes KCA puis isolées sur des boîtes BHI. Les boîtes d'isolement étaient divisées en 4 parties égales pour limiter la consommation de milieu et de consommable dans une optique de durabilité. Après l'incubation des boîtes 2 jours dans l'étuve à 30°C, les souches isolées étaient repiquées dans une plaque stérile à 96 puits contenant 1 ml de milieu BHI liquide par puit. Ces plaques étaient mises à l'étuve de 30°C, incubées 1 jour. Le lendemain la culture de chaque puit était dupliquée dans 2 autres plaques et mélangée (v/v) à 0.5ml de glycérol (30%) servant de cryoprotecteur, (concentration finale 15% glycérol) avant d'être stockées au -80°C en attente des analyses ultérieures.

### **2.3.6 Centrifugation pour l'analyse ultérieure d'attaque par des bacteriophages**

Dans le cadre de la thèse de Lucas il est prévu de tester la présence de phages dans le Gwell. Nous avons donc réalisé un échantillonnage sur les ferments à semaine S0 et S4.

Pour ce faire 50 g de ferment était centrifugé à 10000 G pendant 10 minutes à 4°C dans un tube flacon de 50 ml. À l'issue de la centrifugation au froid, l'échantillon était constitué de 3 parties, le culot contenant les caséines, le surnageant liquide pouvant contenir les phages et à la surface la crème solidifiée par le froid. Cette partie supérieure contenant la crème était enlevée à la spatule et le surnageant était filtré premièrement au tamis cellulaire Clearline 70 µm et puis sur un filtre Sartorius de 0,2 µm. Le filtrat était conservé à 4°C pour l'analyse ultérieure.

### **2.3.7 Conservations des échantillons**

#### **a. Conservation à -80°C**

Pour chaque ferment/Gwell frais analysé, un échantillon a été stocké à -80°C pour servir de double de sauvegarde. Pour chaque échantillon, une même quantité de lait était ajouté comme un cryoprotecteur, et était réparti dans 4 tubes cryo de 4,5 ml pour

une conservation à -80°C. Ce mode de conservation avait été testé et validé lors de l'étude du sujet précédent « Sécurisation de la production du Gwell ».

### **b. Conservation à -20°C**

Deux sachets de congélation à fermeture double zip d'environ 200 ml de chacun des échantillons de Gwell étaient systématiquement prélevés et congelés à plat à -20°C. Une partie serait utilisée pour l'analyse HPLC (dosage acide lactique notamment). L'autre servirait à l'analyse méta-génomique de l'écosystème du Gwell après l'extraction de l'ADN total dans le cadre de la thèse de Lucas Von Gastrow.

## **2.3.8 Analyses physicochimiques du lait**

La qualité biochimique du lait joue un rôle important sur la texture du Gwell (onctuosité, aspect filant ou cassant, acidité). Le lait est aussi la source de nutriments pour le développement des microorganismes. Les analyses physicochimiques des laits utilisés pour la fabrication nous permettront de comparer les différents constituants en présence (source d'azote et de carbone) et de relier à la texture et au goût des Gwells.

### **a. Matière sèche**

Par matière sèche on entend la masse restant après la dessiccation complète. Elle englobe des glucides (lactose principalement), des protéines (caséine et protéines solubles), des matières grasses et des minéraux. Environ 5 ml lait étaient ajoutés dans capsule contenant d'environ 25 g de sable préalablement séché. Après mélange et étuvage une nuit dans une étuve ventilée à  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ , l'extrait sec du lait était obtenu par différence pesée entre le mélange sable-lait humide et sable-lait séché. Le résultat est donné en grammes par litre de lait. (ANNEXE 1)

### **b. Matière grasse**

Le lait de vache Bretonne Pie Noir est réputé comme étant plus riche/gras que le lait des autres races. La détermination de la teneur en matière grasse du lait a été réalisée selon la méthode acido-butyrométrique de Gerber. (ANNEXE 2)

### **c. Matière azotée**

La teneur en azote des laits utilisés pour la fabrication des Gwells a été déterminée par la méthode Kjeldahl. (ANNEXE 3)

## 3 Résultats et discussion

Les essais dont les résultats sont présentés ci-après se sont déroulés sur une période de 10 semaines avec un recouvrement des prélèvements au sein des trois fermes afin d'optimiser le plus possible le temps nécessaire à cette expérimentation. 84 suivis cinétiques d'acidification des Gwell, 279 dénombrements sur 3 milieux (soit près de 4200 boîtes observées) et pour les laits 15 analyses physico-chimiques effectuées sur la totalité de la période. À ces suivis il faut ajouter en plus les prélèvements et leur échantillonnage pour la réalisation des expérimentations qui seront faites dans le cadre de la thèse de Lucas Von Gastrow (analyse de la communauté microbienne par méta-barcoding, recherche de phages, collecte d'isolats des deux sous-espèces *lactis* et *cremoris* afin de déterminer leur fitness, le fitness traduisant l'adaptation des bactéries à leur environnement). Un total de 621 échantillons et 1242 isolats bactéries collectes ont ainsi été prélevés, numérotés et stockés avec la mise en place d'un système de gestion des échantillons via le logiciel Labcollector.

### 3.1 Suivi du pH

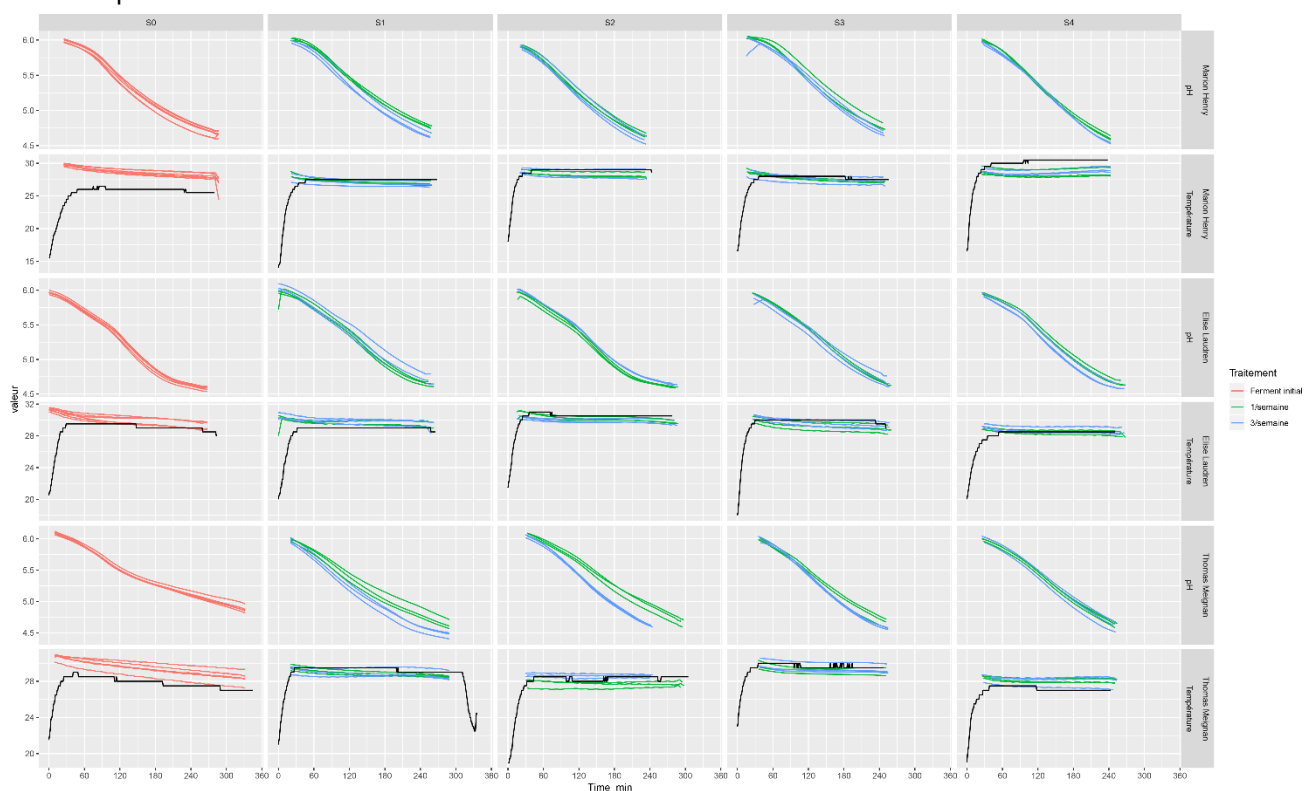
L'acidification est un paramètre important lors de la fabrication du Gwell, et des produits fermentés en général. Elle permet en effet de limiter très fortement le développement de microorganismes indésirables, et notamment des pathogènes (Fox et al., 2015). Les suivis de pH ont été réalisés sur les deux séries servant à l'étude de l'influence de la fréquence des repiquages. Les courbes d'acidification sont présentées en Figure 5 (voir la page suivante).

Le pH initialement à 6 en moyenne descend pour atteindre pH 4,6 au bout de 4 heures pour les Gwells de Henry et de Laudren. Le Gwell de Meignan en revanche présentait une acidification plus lente au point initial S0. C'était un ferment relativement "âgé" puisque préparé 13 jours plus tôt, dont les microorganismes avaient probablement subi une mortalité importante. Cependant l'acidification pour ce Gwell atteignait de nouveau une vitesse d'acidification comparable après 2 repiquages.

Comparaison des vitesses d'acidification en fonction de la fréquence de repiquage : pour le Gwell de Meignan, le retour à une vitesse d'acidification normale se fait plus rapidement pour les Gwells repiqués 3 fois par semaine. La différence la plus marquée se présente lors de la deuxième semaine (S2). Pour les semaines suivantes, la vitesse d'acidification des deux séries devient similaire. Chez Laudren les Gwells repiqués trois fois par semaine acidifient plus lentement que ceux repiqués trois fois par semaine lors de la première semaine (S0). La vitesse d'acidification des deux séries évolue au cours du temps, et les Gwell repiqués trois fois par semaine acidifient le plus rapidement à la fin de l'expérimentation à l'issue de la 4<sup>ème</sup> semaine (S4). Chez Henry les Gwells repiqués trois fois par semaine acidifient plus rapidement

mais la différence est moins marquée. Les résultats obtenus pour le Gwell de Meignan semblent indiquer que ce serait plutôt le nombre de repiquages au lieu de la fréquence de repiquages qui influencent la vitesse d'acidification avec au bout d'un certain nombre de repiquages une stabilisation de la vitesse.

**Figure 5 : Courbes d'acidification et suivi de température pendant la fermentation correspondante.** La température au sein de l'étuve suivie par thermobouton (enregistrement chaque minute) s'affiche en noir. La température et pH suivies par électrodes iCinac dans les pots se présentent en couleur : première fermentation à S0 en utilisant le ferment initial en rouge ; les fermentations suivantes qu'on a repiquées une fois par semaine en vert ; celles repiquées trois fois par semaine en bleu.

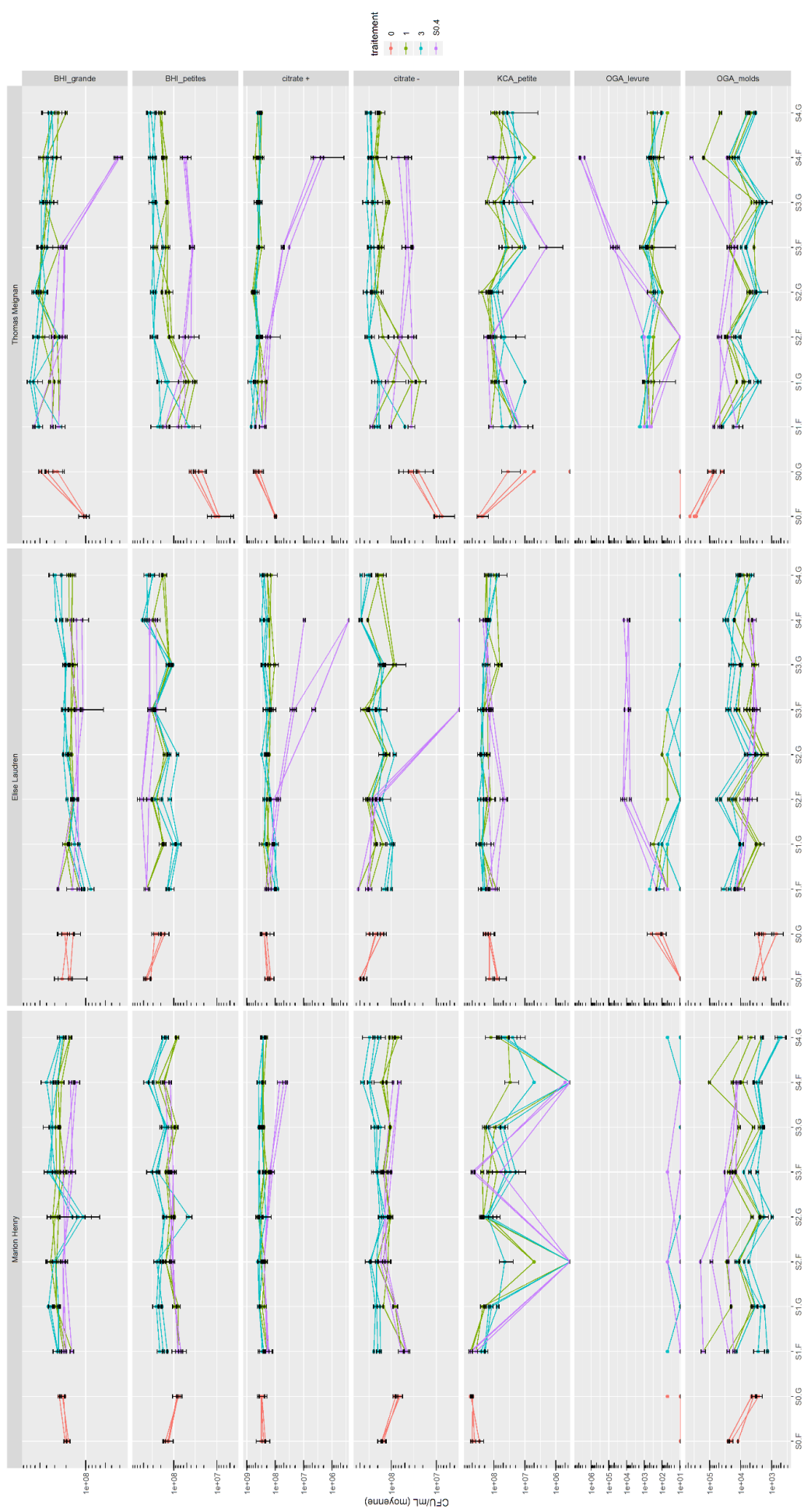


La figure 5 permet également de suivre la température des échantillons au cours de la fermentation (suivie grâce aux électrodes de pH du systèmes iCinac, courbes en couleur) ainsi que la température au sein de l'étuve (mesurée par thermobouton, courbe en noir). On observe sur cette figure qu'il y a très peu de différences entre les deux séries et l'étuve au cours d'une même fabrication. La température de fermentation dans les pots est stable et comprise entre 28 et 29°C.

### 3.2 Résultats de dénombrement

Les dénombrements ont été réalisés le jour de la fabrication sur les échantillons de Gwell frais et le lendemain pour les échantillons de ferment. Les résultats sont présentés en Figure 6.

**Figure 6 : Résultats des dénombrements pour les séries 1/semaine, 3/semaine et S0.4.** Ce graphique regroupe par l'origine des échantillons et les différentes formes des colonies sur chaque milieu. L'échelle verticale est logarithmique. L'axe horizontal suit le temps des expérimentations, de S0 à S4 et implique aussi le type d'échantillon, ferment ou Gwell frais. Les courbes rouges servent aux dénombrements à tout début S0, les Gwells frais produits à partir des ferments initiaux et les ferments utilisés. Ensuite, la série de 1/semaine se présente en vert, 3/semaine en bleu, S0.4 en violet.



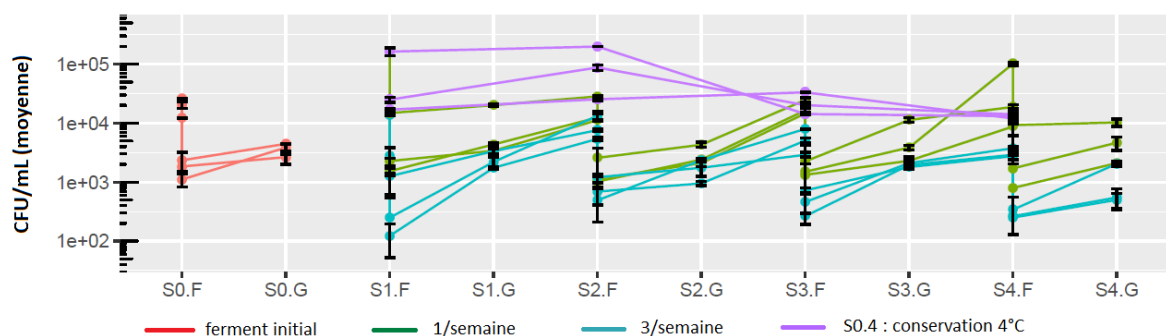
Cette figure ne fait pas apparaître les résultats des deux séries de contrôles à 4°C et à 30°C. En effet dans ces contrôles, surtout pour le contrôle à 30°C, on a observé une modification très importante de la communauté microbienne. Des colonies de morphologies variées apparaissaient sur milieu BHI dont l'observation microscopique a montré que la population de lactocoques était remplacée par des bacilles.

Pour les Gwell repiqués une ou trois fois par semaine, des colonies de même forme mais de taille différente étaient retrouvées sur milieu BHI. Ce milieu est censé permettre le dénombrement et l'isolement des bactéries exigeantes et difficilement cultivables sur d'autres milieux. Les échantillonsensemencés sur ce milieu étaient dilués aux dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ , les colonies que l'on retrouve à ces dilutions correspondent donc à la flore dominante, c'est-à-dire *Lactococcus lactis*. Observées au microscope, les grandes colonies présentaient une morphologie de coque, associés deux par deux, ce qui correspond à la morphologie microscopique de la sous-espèce *lactis* ; les petites colonies présentaient également une allure de coque mais associés en longues chaînes, ce qui correspond à la morphologie microscopique de la sous-espèce *cremoris*. Leur numération était équivalente à celle obtenue sur le milieu KCA avec et sans halos respectivement.

Le milieu KCA a permis de dénombrer la sous-espèce *lactis* (colonies avec halos) à un ordre de grandeur de  $10^8$  UFC (Unité Formant colonie) par millilitre de Gwell. Le nombre pour la sous-espèce *cremoris* est du même ordre de grandeur. La quantité de *lactis* est stable pendant les 4 semaines d'expérimentations malgré l'environnement changeant. En revanche, la population de *cremoris* affiche une allure variant en fonction de l'étape de fabrication. Il y a moins de *cremoris* dans les Gwells frais que dans les ferments. Nous avons également retrouvé sur le milieu KCA des colonies très petites (difficile à dénombrer à l'œil nu) dont l'identification par galerie API 50CHL a montré qu'il s'agissait en fait de souches appartenant à l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Leur dénombrement s'est avéré non fiable du fait de la difficulté de lecture des boîtes. Les dénombrements obtenus sur milieu OGA pour les moisissures (souches bien blanches, plus ou moins feutrantes) étaient de l'ordre de  $10^4$  UFC/mL. On observe un graphique en « dents de scie » sur la figure 3.2 pour les deux séries en fonction de la fréquence de repiquage : le ferment contenant plus de moisissure que le Gwell frais.

Afin de déterminer la croissance des moisissures à 4°C ou à 30°C, le point initial de dénombrement "F" été corrigé avec un rapport de 1/11 ce qui correspond au niveau d'ensemencement (100g de ferment dans 1kg de lait). Ainsi le résultat obtenus pour le Gwell de Henry est présenté en Figure 7. On observe que les moisissures se développent au même niveau dans le Gwell après 4h à 30°C ou après une semaine à 4°C, les pentes S1.F-S1.G et S1.G-S2.F étant similaires. Les moisissures dénombrées ont été identifiées elles appartiennent à l'espèce *Geotrichum candidum*. La température optimale de cette espèce est de 25°C à pH 5,0 – 5,5 (Pitt and Hocking, 2009).

**Figure 7 : Évolution des moisissures au cours de la fermentation et de la conservation chez Henry.** Les points F présentent en deux valeurs : une correspond au dénombrement du ferment et relie avec le Gwell frais de la semaine dernière ; l'autre obtenu par la division 1/11 du dénombrement du ferment correspond au dénombrement en début de fermentation et relie avec le Gwell frais de la même semaine.



Des colonies avec une morphologie de levures (souches lisses de couleur crème) étaient retrouvées sur le milieu OGA pour les Gwells des trois éleveurs. Mais leur quantité était extrêmement variable : quasiment aucune chez Henry, une centaine d'UFC/mL chez Laudren au début de l'expérience puis aucune à la fin, et environ  $5 \cdot 10^2$  UFC/mL chez Meignan.

En ce qui concerne les contrôles S0.4, conservés à 4°C tout le long de l'expérience et analysés chaque semaine, dans ces échantillons la communauté microbienne évolue beaucoup tout au long de la conservation. La quantité de *Lactococcus lactis* diminue. La quantité de levures augmente mais celle de moisissures diminue. Pour les Gwells de Meignan et de au Laudren, une caractéristique morphologique spécifiques à *Geotrichum candidum* pourrait expliquer cette variation. En effet, cette espèce adapte en sa morphologie aux conditions de culture, pouvant prendre un aspect soit levuriforme, soit de moisissure ou même intermédiaire en fonction de l'environnement (Gueguen et al., 1982). La quantité de levures et moisissures détectée est inférieure de 4 log à celle des bactéries lactiques mais ces champignons jouent très probablement un rôle non négligeable dans le goût et l'arôme du Gwell.

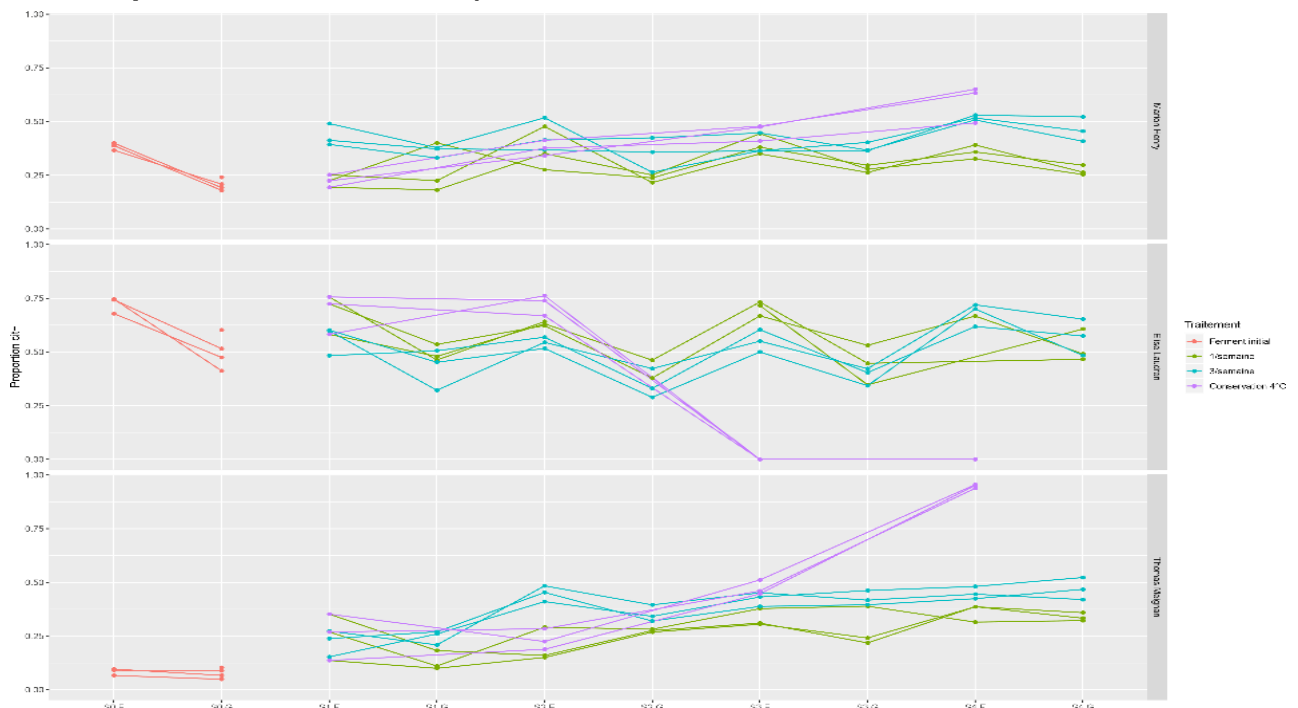
### 3.3 Variation de proportion des différentes espèces en réponse aux variations de la fréquence de repiquage

Les résultats des dénombrements présentés en figure 7 avec une échelle logarithmique fait apparaître qu'il y a un impact notable de la fréquence du repiquage sur la quantité de microorganisme, surtout de moisissure et de *cremoris*. Et ce alors que ce type d'échelle présente le défaut de minimiser les différences.

Premièrement, les moisissures sont présentes à des niveaux variables chez les trois éleveurs avec respectivement  $10^4$  UFC/mL,  $3.10^3$  UFC/mL et  $3.10^5$  UFC/mL chez les producteurs Henry, Laudren et Meignan. On observe une différenciation en fonction de la fréquence de repiquage après une semaine d'expérimentation. On retrouve plus de moisissures dans les Gwell repiqués 1 fois par semaine que dans ceux repiqués 3 fois par semaine. Le résultat est cependant inverse pour les Gwell préparés chez Laudren. Les moisissures du Gwell de cette éleveuse présentaient une morphologie différente de celles des Gwell des deux autres éleveurs, on peut donc supposer qu'il s'agit de souches différentes. La fréquence de repiquage influencerait donc la quantité de moisissure, mais de manière variable selon les souches impliquées.

Deuxièmement, on observe, pour les ferments initiaux, chez les trois éleveurs, une quantité différente de la sous-espèce *cremoris* avec respectivement  $2.10^8$  UFC/mL,  $4.10^8$  UFC/mL et  $1.10^7$  UFC/mL chez Henry, Laudren et Meignan. On dénombre un log de moins dans le ferment de Meignan ce qui s'explique par le fait que le ferment était "âgé" (13 jours de conservation). En revanche le niveau observé dans ce ferment rattrape les niveaux observés chez les autres éleveurs en fin d'expérimentation. On trouve quasiment systématiquement plus de *cremoris* dans les Gwell repiqués 3 fois par semaine que dans ceux repiqués 1 fois par semaine, en quantité absolue mais également en proportion par rapport aux *L. lactis* sp. *lactis*. Il est intéressant de noter que cette proportion est différente en fonction des éleveurs (résultats présentés en Figure 8) : Les Gwells de Henry et Meignan ont en moyenne un ratio de 35% de *cremoris* alors que la ration est de 55% pour le Gwell de Laudren.

**Figure 8 : Évolution de la proportion des bactéries citrate négatives (ration sous-espèces *cremoris* / *lactis*)**

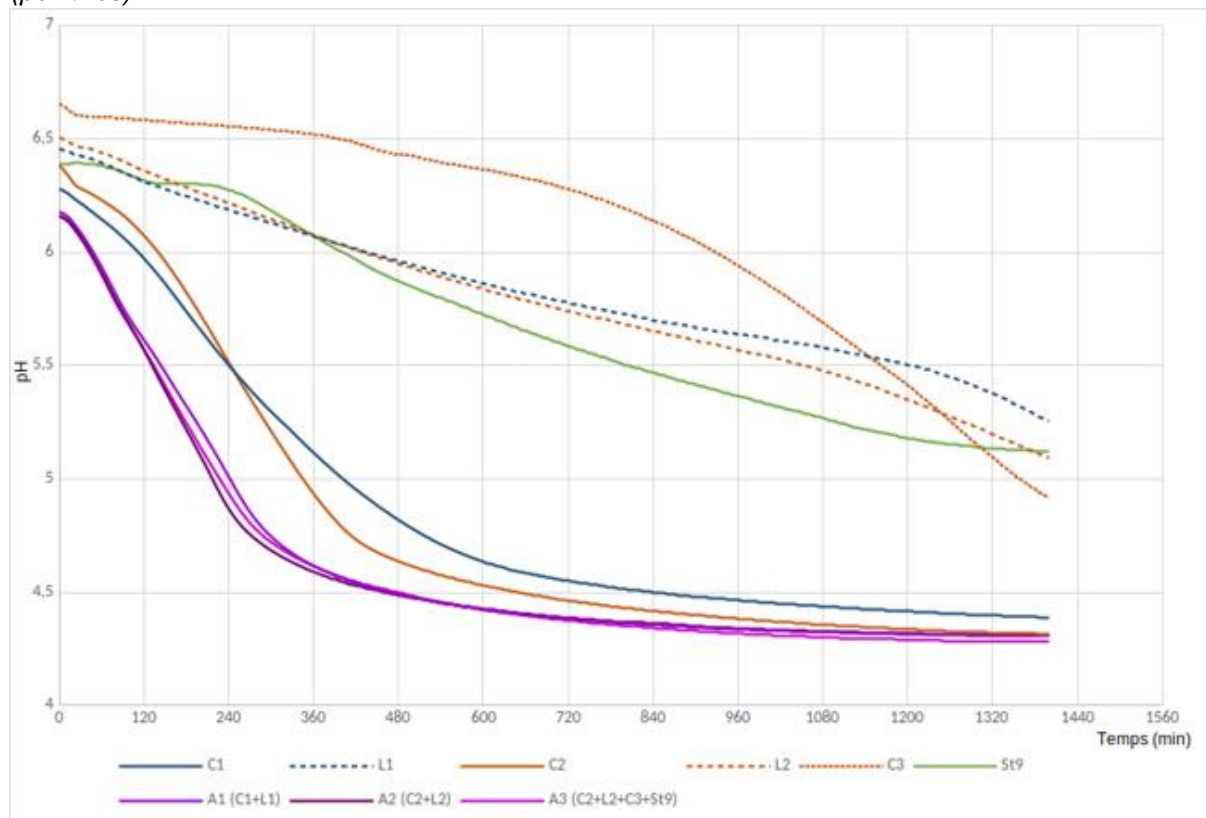




### 3.4 Lien entre la proportion des différentes espèces et la vitesse d'acidification

Le métabolisme anaérobie des bactéries lactiques conduit à la baisse de pH. En fonction des espèces elles ont différentes capacités d'acidification (Bergey et al., 2001. Dalmasso et al., 2008). Dans nos Gwell, on trouve trois espèces différentes : *Lactococcus lactis* sp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* sp. *lactis* et *Streptococcus thermophilus*. Les courbes d'acidification du lait par les souches pures de ces différentes espèces et des mélanges de ces mêmes souches sont présentées en Figure 9. Le lien entre la proportion des différentes espèces et la vitesse d'acidification a été analysé pour les trois fermes.

**Figure 9 : Suivi d'acidification du lait par les souches pures et associations des souches.** « L » = *lactis* (tirets) ; « C » = *cremoris* (traits pleins) ; « St » = *Streptococcus thermophilus* (pointillés).



Chez Henry : la quantité de *cremoris* est plus grande pour le série 3/semaine. Ces Gwells acidifient plus vite et finissent à un pH plus bas après 4 heures de fermentation. Ce résultat est donc cohérent avec l'acidification des souches pures, les souches de la sous-espèce *lactis* acidifiant plus lentement que les autres.

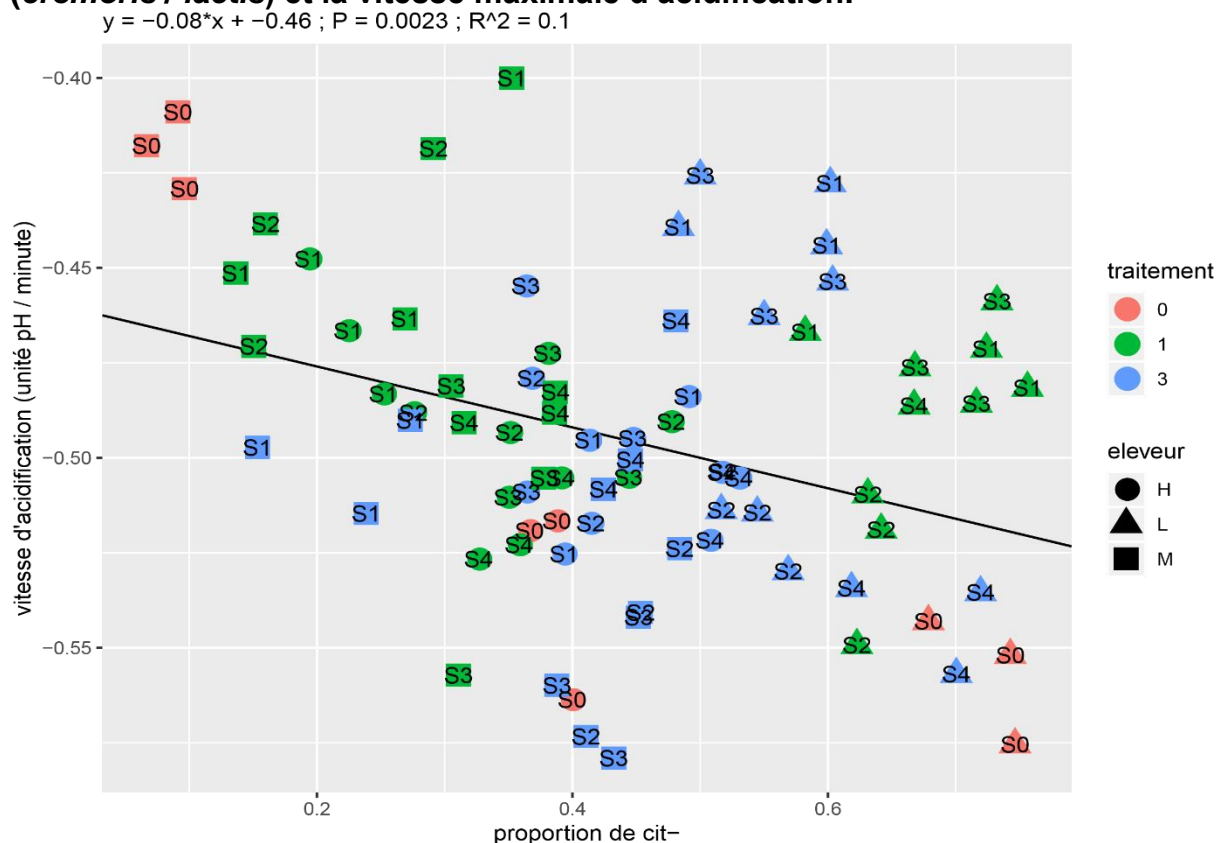
Chez Laudren : en plus de l'obtention du même résultat, nous avons observé deux pentes marquées sur la courbe d'acidification. L'acidification est lente pendant les

deux premières heures de fermentation et s'accélère ensuite. Ce type de cinétique est caractéristique d'une acidification par *Streptococcus thermophilus*. Cette observation est cohérente avec les résultats de dénombrement, les Gwell de Laudren présentant plus de *Streptococcus thermophilus* que les autres, leur niveau restant stable tout au long de l'expérience, à environ  $2.10^8$  UFC/mL.

Chez Meignan : le Gwell à S0 présentait une baisse d'activité notable. Nous y avons dénombré trois fois moins de *lactis* et dix fois moins de *cremoris* que comparé au Gwell "normal". L'acidification très ralentie peut s'expliquer par cette forte baisse du nombre de *cremoris*. On observe en effet que la vitesse d'acidification augmente de semaine en semaine parallèlement à la quantité de *cremoris*.

Afin de vérifier que la sous-espèce *cremoris* joue un rôle central dans l'acidification du Gwell, nous avons essayé mettre en évidence un lien entre la vitesse d'acidification et la quantité de *cremoris* qui est présenté en Figure 10. La ligne de régression était établie par un modèle simple, en expliquant la proportion de *cremoris* par la vitesse maximale d'acidification. Le test sur ce coefficient dans le cadre de régression linéaire était effectué par Test de Student. Nous avons obtenu une p-value de 0,0023 (inférieur à 5%) et un coefficient de détermination  $R^2$  de 0.1.  $R^2$  permet d'exprimer la proportion de la variance des données qui est expliquée par notre variable. Dans notre cas elle est de 10 %, ce qui signifie que s'il y a potentiellement une corrélation entre proportion de *cremoris* et la vitesse maximale d'acidification de nombreux autres facteurs influencent aussi cette vitesse.

**Figure 10 : Relation entre la proportion de lactocoques citrate négatives (*cremoris* / *lactis*) et la vitesse maximale d'acidification.**



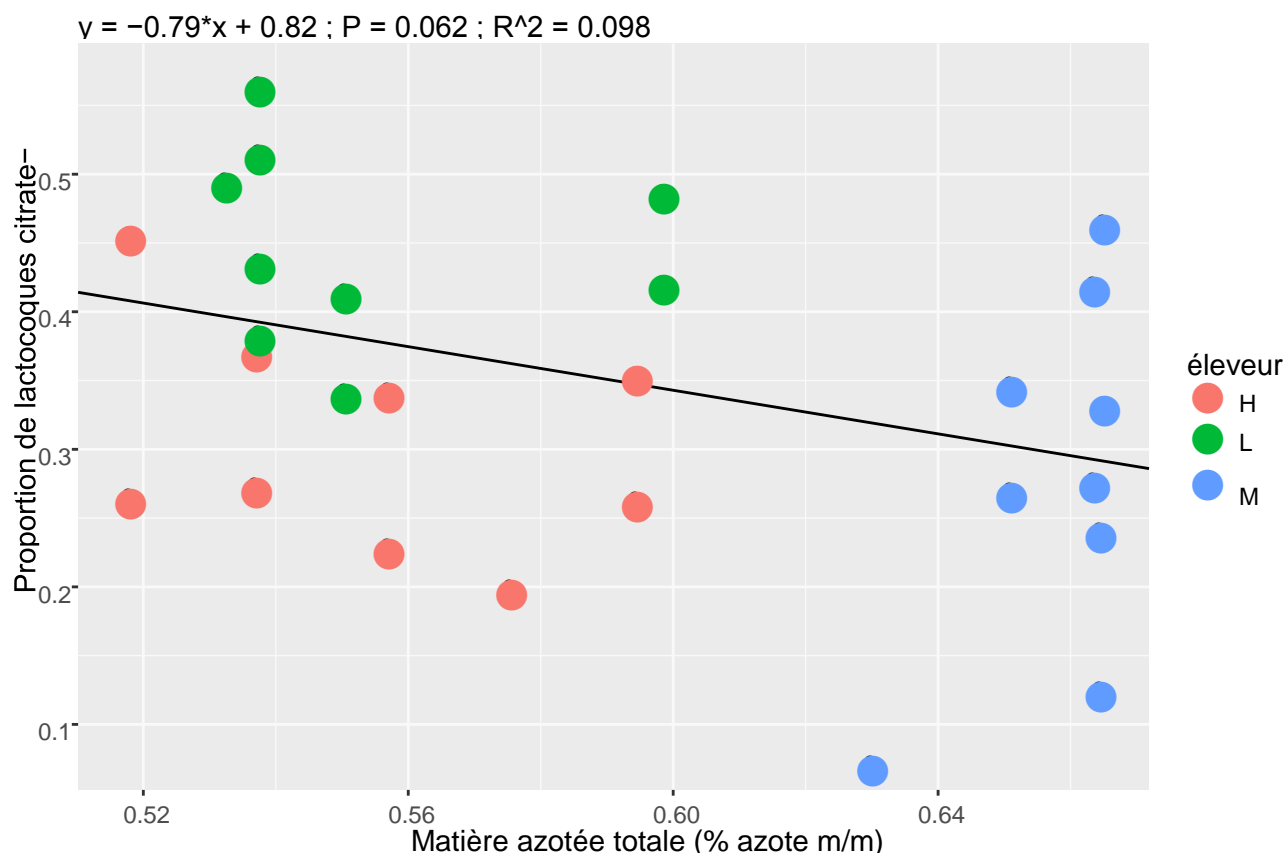
### **3.5 Sélection différentielle des différentes espèces en fonction des changements d'environnement – passage à 30 et 4°C**

Les variations d'environnement lors de la fabrication du Gwell correspondent principalement à des variations de température : 30°C pendant la fermentation et 4°C pendant la conservation. Nous avons observé visuellement dans les graphiques de dénombrement des allures en « dent de scie » pour la quantité de *cremoris* et de moisissures. Lors du suivi cinétique nous avons observé chaque semaine que les ferments présentaient moins de *cremoris* et de moisissures que les Gwells frais fabriqués dans la journée (sauf pour le point initial chez Thomas). Leur quantité continue d'augmenter pendant la conservation à 4°C. Dans le Gwell frais, la quantité de *lactis* atteint un niveau égal ou supérieur à celle observée dans le ferment utilisé le jour-même, puis reste stable voire diminue pendant la conservation. Les microorganismes et plus spécifiquement dans notre cas les deux sous espèces de lactocoques *lactis* et *cremoris* ont donc un développement différent en fonction du type d'environnement. C'est cette dynamique qui permet le maintien des microorganismes du Gwell : *lactis* étant favorisée par rapport à *cremoris* à 30°C, mais défavorisée à 4°C. Ainsi sur un cycle de fabrication régulier avec l'alternance 30°C/4°C aucune des deux sous-espèces ne peut prendre le dessus sur l'autre et les deux sous espèces se maintiennent au cours du temps.

### **3.6 Impact de la composition du lait**

Les variations de composition en matières protéique, lipidique et glucidique du lait peuvent influencer sur la croissance des microorganismes (Ganzle, 2015). Ces variations pouvant être espèces dépendantes voir souche dépendante. Nous avons pu ainsi mettre en évidence une corrélation entre la composition du lait et la proportion de *cremoris*. La figure 11 semble montrer une tendance selon laquelle la population de *cremoris* semble négativement corrélée à la quantité de matière azotée totale (même tendance pour la matière grasse).

Figure 11 : Lien entre la quantité de matière azotée totale du lait et la proportion de lactocoques citrate négatives (*cremoris / lactis*)



## 4 Conclusions et perspectives

L'ensemble des expérimentations réalisées dans le cadre de ce stage est basée sur deux séries de repiquage, « fréquent » et « long ». Ils nous permettent d'analyser l'évolution de la communauté microbienne du Gwell dans le cadre d'un environnement changeant.

Les résultats issus de l'analyse microbiologique du Gwell au cours du temps montrent que la communauté microbienne de ce dernier est constituée de 2 bactéries lactiques mésophiles (Samarzija et al., 2001), dominantes par rapport aux autres flores : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* à un niveau de population de  $5.10^8$  UFC/mL de Gwell. Le rapport entre *cremoris* sur le total des 2 sous-espèces étant variable selon les fermes et compris entre 0,1 et 0,75. La présence de levures et moisissures est à un niveau de  $10^4$  voire  $10^5$  UFC/mL. Le nombre de bactéries lactiques thermophiles *Streptococcus thermophilus* est à un niveau de  $10^8$  UFC/mL ce qui est étonnant car la technologie mise en œuvre n'est *a priori* pas favorable au développement des espèces thermophiles (Bergey et al. 2011).

Nous avons également mis en évidence grâce aux résultats obtenus que la composition microbienne du gwell et plus spécifiquement le rapport entre les deux sous-espèces *lactis* et *cremoris* était influencé par l'environnement (température). On observe ainsi que ces deux sous-espèces ont une fitness différente à 30 et 4°C. En effet *cremoris* est défavorisée à 30°C mais continue de se développer à 4°C avec une croissance ralentie, tandis que *lactis* ne se développe plus voire présente une chute de viabilité. La variation environnementale temporelle permet donc le maintien des deux sous espèces dominantes de l'écosystème du Gwell, en favorisant successivement l'une puis l'autre. La fréquence du repiquage, c'est à dire le temps du maintien à 4°C entre 2 fabrications, régule ainsi la proportion des deux sous-espèces. L'objectif de notre étude était d'essayer de comprendre les mécanismes à l'origine de la dérive du ferment en se focalisant sur les deux sous espèces *lactis* et *cremoris* et nous avons ainsi vérifié l'hypothèse selon laquelle la fréquence des repiquages du ferment étaient au moins en partie reliée aux problèmes d'instabilité observés. En effet d'autres facteurs peuvent intervenir, ainsi nous avons montré un effet potentiel de la composition du lait sur le ratio des deux sous espèces *lactis* et *cremoris*. Les résultats que nous avons obtenus ici pour un lait fermenté à flore dominante mésophile sont en accord avec les conclusions issues de l'étude de Dalmaso et al (2008) dans le cadre de la fabrication de fromages obtenus par le même type d'ensemencement que nous (back-slopping). Dans cette étude les auteurs ont étudié un levain modèle reconstitué composé de deux souches *L. lactis* sp. *lactis*, une souche de *L. lactis* sp. *cremoris* et une souche de *L. lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Ils ont montré une corrélation entre la capacité de certaines de ces souches à dominer l'écosystème (modification de l'équilibre initial entre les souches) et des dérives d'acidification notable voire une absence d'acidification.

Les résultats que nous avons obtenus restent cependant à compléter, en effet nous avons mis en évidence un développement différentiel des deux sous-espèces en fonction de l'environnement au niveau de la communauté microbienne, il reste à confirmer cette observation au niveau des individus. De plus, la dérive du ferment est probablement un phénomène multi-factoriel pouvant résulter d'autres perturbations que les changements de température. Des expérimentations complémentaires sont ainsi nécessaire avec entre autre :

- Identification de phages éventuellement présents dans les échantillons.
- Identification des espèces atypiques dans les contrôles 4 et 30°C ainsi que des microorganismes non détectés par culture, et validation de l'identification de *Streptococcus thermophilus* par méta-barcoding.
- Caractérisation de la fitness des souches de *lactis* et de *cremoris* (1242 isolats collectés) à 30 et 4°C, afin de valider au niveau des individus l'hypothèse selon laquelle ces deux sous-espèces ont un développement inverse à 30°C et à 4°C.

Ces expérimentations seront réalisées dans le cadre de la thèse de Lucas von Gastrow et mobiliseront notamment les échantillonnages réalisés dans le cadre de mon stage, en parallèle des suivis cinétiques d'acidification.

# Bibliographie

- Bergey D., Boone D., Castenholz R., Garrity G. Brenner D., Krieg N. Staley J., De Vos P. & Goodfellow M. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol3, Editor-in-chief Springer.
- Bouton, Y., Tessier, L., Guyot, P. and Beuvier, E. (2005), "Relations entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à comté", *Renc. Rech. Ruminants, Volume : 12* p.403.
- Boutrou, R : Gueguen, M (2005). "Interests in *Geotrichum candidum* for Cheese Technology", *International Journal of Food Microbiology*. 102(1) : 1\_20. doi : 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028. PMID 15924999
- Codex alimentarius – Lait et produit laitiers (2011), Organisation Mondiale de la Santé, 2ème édition
- Dalmasso M., Prestoz S., Rigobello V. and Demarigny Y., "Behavior of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four Lactococcus Strain Starter during Successive Micheline Gueguen, J. Jacquet. Etudes sur les caractères cultureux et la morphologie de *Geotrichum candidum* Link. *Le Lait*, INRA Editions, 1982, 62 (621\_622), pp.625-644.
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA (2015) *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing Milk Cultures", *Food Science and Technology International* 2008 14: 469
- Ganzle (2015) Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentation and food spoilage. *Curr. Opinion Food Sci.* 2, 106-117
- Leborgne, A. (1998). Etude géographique et socio historique diu gros lait. *Revue semestrielle Aprolaezh*
- Morinière C (2017). Quand la valorization alimentaire encourage la preservation d'une race: le cas dela race bretonne Pie Noir. *Revue Ethnozootecnie* N°103
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. Springer Science & Business, Media, New York, USA.
- Samarzija, D., Antunac, N. and Luka, J.(2001), "Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis* : a review", *Mljekarstvo* **51**(8), 35-48.
- Tamang J.P. & Kailasapathy K. (2010) *Fermented Food and Beverages of the World*. CRC Press

# Annexes

**Annexe 1** MO-METHO-ANB-ZZ-19 : Lait et produits laitiers: Détermination de l'extrait sec par Méthode étuvage

**Annexe 2** MO-METHO-ANB-ZZ-24 : Lait : Détermination de la teneur en matière grasse par Méthode acido-butyrométrique

**Annexe 3** MO-METHO-ANB-ZZ-13 : Lait et produits laitiers : Détermination de la teneur en azote par Méthode Kjeldahl