



ACTION FAVORISANTE DU BACILLUS SUBTILIS DANS LA FERMENTATION LACTIQUE. - LE "RATTRAPAGE" DU LAIT

Ch. Porcher, Laurent Lambert

► To cite this version:

Ch. Porcher, Laurent Lambert. ACTION FAVORISANTE DU BACILLUS SUBTILIS DANS LA FERMENTATION LACTIQUE. - LE "RATTRAPAGE" DU LAIT. *Le Lait*, 1930, 10 (96), pp.640-654. <hal-00894995>

HAL Id: hal-00894995

<https://hal.science/hal-00894995v1>

Submitted on 11 May 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.



HAL Authorization

se neutralisent et s'alcalinisent en suivant un mouvement uniforme et régulier. Avec les fromages bien salés, la neutralisation n'est pas progressive ; il est des points d'inflexion, et au moment où le *Penicillium* se développe, elle subit presque un temps d'arrêt ;

3^o *Flore superficielle*. Nous avons précédemment montré que les fromages bien salés sont couverts d'*Oidium* et de *Penicillium* ; le « rouge » leur succède. Le *Penicillium* ne se développe pas avec un salage insuffisant ; l'*Oidium* et des bactéries envahissent la croûte des fromages ; cette flore est alcalinisante.

Ces deux flores de composition différente déterminent donc sur le caillé deux réactions de signe contraire. (A suivre).

ACTION FAVORISANTE DU *BACILLUS SUBTILIS* DANS LA FERMENTATION LACTIQUE. — LE « RATTRAPAGE » DU LAIT (1).

par

Ch. PORCHER,

et

L. LAMBERT,

Docteur ès-Sciences physiques.

Docteur-Vétérinaire.

Les microbes capables de sécréter de l'acide lactique au cours de leur développement sont extrêmement nombreux, et la classification la plus moderne et la plus rationnelle nous en a été donnée par ORLA-JENSEN (2). D'autre part, une notion extrêmement intéressante a été mise en valeur par C. GORINI (3) dans de nombreuses publications : c'est celle de l'existence de ferments producteurs à la fois d'acide lactique et de présure, capables par conséquent d'amener la coagulation du lait alors que celui-ci n'a pas atteint une acidité suffisante pour que, sous l'action de l'acide lactique produit, il puisse se former une précipitation de caséine. Le coagulum obtenu dans ces conditions participe à la fois, au point de vue chimique, de la caséine-présure et de la caséine-acide.

Nous savons que l'acidité facilite l'emprésurage (4), et dans ces conditions, pour peu que les ferments lactiques aient une qualité présurigène accentuée, la coagulation du lait apparaîtra plus vite.

A regarder les choses de haut, et en s'appuyant sur les acquisitions de la biologie générale, nous ne devons pas être surpris des faits relevés par C. GORINI et que ses publications successives ont multipliés en

(1) Cet article est extrait d'une thèse de Doctorat vétérinaire présentée devant la Faculté de Médecine de Lyon, et faite dans mon laboratoire (Ch. P.).

(2) ORLA-JENSEN. — La classification des bactéries lactiques. *Le Lait*, 1924, 4, 468.

(3) C. GORINI. — Ma théorie acido-protéolytique sur la maturation des fromages. *Le Lait*, 1927, 7, 36.

(4) Ch. PORCHER. — *Le lait au point de vue colloïdal*. Th. Doct. ès Sc. physiques, Lyon, 1929, p. 258.

reconnaissant le pouvoir lactigène et présurigène à de nombreuses espèces microbiennes. En effet, toute cellule vivante, qu'elle soit du règne animal ou végétal ou qu'elle soit microbienne, sécrète nécessairement des diastases dont le nombre et la qualité conditionnent son propre métabolisme. A la vérité, on est même conduit à admettre que la qualité présurigène des ferments lactiques doit être plus élargie encore que ne l'a fait GORINI, car la présure est un ferment protéolytique et la protéolyse alimentaire est indispensable aux cellules vivantes pour leur fonctionnement. Il ne s'agit ici que d'une question de quantité et la découverte de GORINI a d'abord porté sur les microbes lactiques qui sécrétaient la plus grande quantité de présure.

Dans le cadre des microbes présurigènes de C. GORINI, nous trouvons donc réunis en un seul individu microscopique les pouvoirs de sécréter, d'une part, de l'acide lactique, d'autre part, de la présure. Mais la flore du lait est extrêmement complexe et sa diversité nous fait reconnaître, à côté des espèces plutôt acidogènes, d'autres plutôt protéolytiques, et, dans ces conditions, on est amené à se demander si l'action des protéases sécrétées par ces dernières ne serait pas facilitée par l'acide lactique des espèces acidogènes.

Rien n'est plus facile que de répondre à cette question, puisque nous savons qu'il existe dans le lait tel qu'il est recueilli, c'est-à-dire dans des conditions de propreté plutôt fâcheuses, à côté des ferments lactiques, des formes bacillaires du type *B. Subtilis*. Or, le *B. Subtilis* est un microbe grand producteur de protéases, plus voisines, il est vrai, de la trypsine que de la pepsine, agissant plutôt en milieu alcalin qu'en milieu acide. Mais la production de ces protéases commence déjà avec la réaction du lait dont le pH est plus petit que 7.

L'existence simultanée dans le lait du *B. Subtilis* et des ferments lactiques du type *Str. Lacticus* c'est-à-dire les ferments lactiques ordinaires les plus abondants, les plus constants, nous laissent *a priori* supposer que l'attaque de la caséine sous l'action des protéases du *B. Subtilis*, en mettant en liberté des peptides relativement simples, facilite ainsi le développement des ferments lactiques en leur apportant une alimentation azotée plus adéquate à leurs besoins.

Nous devons à M. S. MARSHALL (1) une étude fort suggestive sur les résultats de l'association du *B. Subtilis* et du *Str. Lacticus* dans le lait. On sait depuis longtemps, fait remarquer cet auteur, que le développement de certains organismes est influencé par celui d'autres organismes qui vivent dans le même milieu que lui. Parfois, c'est l'inverse ; ce sont certains microbes au développement rapide qui finissent par étouffer les autres. Nous allons trouver ici un exemple de ces deux pro-

(1) M. S. MARSHALL. — An associative Study of *Strep. Lacticus* and *B. Subtilis* in milk. *J. of Dairy Science*, 1920, 3, 406 ; Analysé in *Le Lait*, 1921, 1, 41.

cessus, car nous allons voir d'abord le *B. Subtilis* favoriser le développement du *Str. Lacticus* ; ensuite, lorsque ce dernier sera en plein développement, il finira par étouffer le *B. Subtilis* qui disparaîtra.

Le lait étant un excellent milieu de culture et contenant toujours un nombre assez grand de microorganismes d'espèces variées, des relations du genre de celles dont nous venons de parler entre les divers microbes qu'il contient doivent être observées.

M. S. MARSHALL a limité son étude à l'association du *B. Subtilis* et du *Strep. Lacticus*.

Des portions de 100 cm³ de lait stérile étaient ensemencées avec des quantités variables des deux organismes, soit un nombre donné de gouttes mesurées avec la pipette de ROUX. Les flacons étaient conservés à la température ordinaire et les titrations étaient faites au moyen de la soude en présence de la phtaléine du phénol.

Des recherches de M. S. MARSHALL, il apparaît évident que la présence du *B. Subtilis* dans le lait stimule la fermentation lactique à ses débuts et, de l'association des deux microbes en question, il résulte une acidité plus grande que ne serait celle de la culture du ferment lactique seul ; la marche de cette acidité est fonction de la concentration originelle du *B. Subtilis*.

Le tableau I ci-dessous donne la marche de l'acidité selon que le lait a été ensemencé de ferments lactiques seuls ou d'un mélange de ferments lactiques et de *B. Subtilis*.

Dans le premier mélange, on a mis I goutte de chaque culture pour 100 cm³ ; dans le second, on a mis V gouttes de la culture de *B. Subtilis* contre I goutte de celle du *Str. Lacticus*.

TABLEAU I

| Temps en heures | Ferments lactiques seuls | Acidité | |
|-----------------------|--------------------------------|---|------|
| | | Association du <i>B. Subtilis</i> et des ferments lactiques | |
| | | Rapport des gouttes | |
| | | 1/1 | 5/1 |
| 0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| 7,5 | 18,3 | 18,6 | 19,6 |
| 18,0 | 20,7 | 21,3 | 20,3 |
| 21,0 | 25,7 | 26,7 | 28,3 |
| 24,0 | 36,0 | 39,3 | 43,7 |
| 26,2 | 46,7 | 48,7 | 53,3 |
| 30,0 | 52,7 | 58,3 | 63,0 |
| 33,0 | 58,7 | 63,0 | 67,3 |
| 42,0 | 68,3 | 73,3 | 75,3 |
| 48,0 | 69,0 | 76,0 | 73,7 |
| 62,0 | 80,2 | 83,0 | 82,0 |

M. S. MARSHALL a également fait le dénombrement par la méthode

des cultures sur plaque du *B. Subtilis* et du *Str. Lacticus* qui pouvaient pousser simultanément dans le lait.

Le tableau II rassemble les déterminations de l'auteur.

TABLEAU II

| Temps en heures | Ferments lactiques seuls | Association du <i>B. Subtilis</i> et des ferments lactiques | | | |
|-----------------------|--------------------------------|---|-------------|------------|---------------|
| | | Rapport des gouttes | | | |
| | | 1/1 | | 5/1 | |
| | | Subtilis | Lactiques | Subtilis | Lactiques |
| 10,0 | | 82.500 | | 319.000 | |
| 16,0 | 65.500 | 1.230.000 | | 2.050.000 | |
| 20,0 | 406.000 | 3.270.000 | 290.000 | 2.030.000 | 380.000 |
| 24,0 | | 3.180.000 | | 12.720.000 | |
| 28,2 | 11.000.000 | 19.000.000 | 170.000.000 | 12.000.000 | 122.000.000 |
| 45,0 | 126.000.000 | 11.000.000 | 161.000.000 | 8.270.000 | 19.080.000 |
| 49,2 | 343.000.000 | Rien | 980.000.000 | Rien | 1.601.000.000 |

Il est intéressant de constater que le *B. Subtilis* se développe d'abord plus rapidement que le lactique, et d'autant plus, bien entendu, qu'on en aensemencé une plus grande quantité. Au bout de 24 à 28 heures, selon la quantité de *B. Subtilis* ensemencée, le déclin de la culture de ce microbe commence, alors que s'accuse formidablement le développement des lactiques, à un point tel qu'au bout de 50 heures, il n'y a plus de *B. Subtilis* présent. D'abord arrêté dans son développement, il a été finalement tué par le *Str. Lacticus*.

M. S. MARSHALL s'est employé à rechercher s'il existait un optimum des rapports initiaux entre le *B. Subtilis* et le *Str. Lacticus*, et voici les conclusions intéressantes auxquelles il est conduit dans son travail :

1° La présence du *B. Subtilis* dans le lait favorise la fermentation lactique.

2° Plus élevée est la concentration en *B. Subtilis* à l'origine dans le lait, plus grande est l'action stimulante qu'il exerce vis-à-vis du *Str. Lacticus*.

3° La proportion optimum de *B. Subtilis* par rapport au *Str. Lacticus* qu'il faut dans le lait à l'origine pour obtenir la meilleure action stimulante de ce dernier peut varier avec l'origine des souches microbiennes, mais elle est en somme plutôt faible, et dans une des courbes du travail

de M. S. MARSHALL elle est : $\frac{\text{B. Subtilis}}{\text{Str. Lacticus}} = \frac{22}{10.000}$ Il s'agit donc

d'une proportion vraiment petite.

4° L'action stimulante est plus marquée aux basses températures qu'aux températures plus élevées.

* * *

Nous avons repris les recherches de M. S. MARSHALL en étant guidés par d'autres considérations.

On sait que l'industrie laitière, pendant l'été, alors qu'elle reçoit souvent des laits hyperacides, s'efforce d'en neutraliser l'acidité exagérée pour la ramener au taux normal ou voisin de la normale, en tout cas à un taux permettant d'utiliser le lait traité pour les usages auxquels il est couramment destiné. C'est ce qu'on appelle « rattraper » le lait, voulant dire par là qu'on cherche à le ramener à un emploi normal dont une hyperacidité l'éloignerait. C'est surtout en fromagerie que ce « rattrapage » est tenté. Il ne saurait se faire avec des bases alcalines, potasse ou soude, ou avec les carbonates ou bicarbonates de ces bases, car, dans ce cas, le « rattrapage » ne serait réalisable que pour des laits destinés à être consommés en nature. En présence d'une hyperacidité lactique, la neutralisation ou l'abaissement du taux de celle-ci n'aboutit en somme qu'à la formation de lactate de sodium, puisque c'est généralement le bicarbonate de sodium qui est le seul employé en la circonstance.

Nous ne rappellerons pas que cette opération n'est pas licite et ce n'est rien moins qu'une fraude poursuivie par la loi ; mais, pour l'instant, ce n'est pas cette question que nous envisageons ici, et nous renvoyons à la thèse de H. COMMÉNY (1).

On ne saurait, en effet, « rattraper » le lait avec des bases alcalines ou leurs carbonates et bicarbonates correspondants, parce qu'on introduirait dans le lait une telle quantité de soude que l'emprésurage en serait entravé, ou s'il se faisait cependant, on obtiendrait un caillé mou engendrant des pertes considérables lors du rompage. Les sels alcalins déversés en excès dans le lait sont des sels *peptisants* qui s'opposent à la coagulation par la présure. Le « rattrapage » en vue de l'industrie fromagère ne peut se faire qu'avec des bases alcalino-terreuses ou de la magnésie, car l'on fait ainsi des lactates de calcium ou de magnésium, sels *coagulants* qui favorisent l'emprésurage. Mais cette opération a une limite. On sait, en effet, qu'en présence d'une grande quantité de sels de calcium solubles, la caséine peut précipiter, et que cette précipitation est aidée par la chaleur. Toute la préparation du sérum chloruro-calcique en vue de son examen au réfractomètre est basée sur cette réaction, et nous renvoyons pour cette question à l'excellent travail de A. LATAIX (2). La réussite de l'opération ne dépend pas de l'anion du sel calcique, car tout autre sel calcique soluble pour-

(1) H. COMMÉNY. — L'addition du bicarbonate de sodium au lait. Conséquences chimiques et microbiennes. Considérations sur le contrôle obligatoire des étables. *Th. Doct. Vét.*, Lyon, 1929.

(2) A. LATAIX. — Contribution à l'étude de la réfractométrie des lacto-sérums. *Th. Doct. Vét.*, Lyon, 1928, et *Le Lait*, 1929, 9, 474, 612, 711 et 844.

rait être utilisé dans les mêmes conditions ; elle dépend uniquement d'une certaine quantité de chaux soluble. Par conséquent, quand on « rattrape » un lait hyperacide avec de la chaux, on fait du lactate de calcium, lequel est soluble et joue le même rôle que le chlorure du même cation que l'on utilise dans la préparation du sérum chloruro-calcique. Aussi les laits « rattrapés », pour peu que leur acidité acquise ait été assez forte, renferment donc une assez grande quantité de lactate calcique, et si l'on portait ces laits au B.-M. bouillant, on obtiendrait aisément leur coagulation.

Mais c'est là une température qui n'intéresse nullement l'industrie fromagère, laquelle ne dépasse jamais pour ses emprésurages la température de 31°-32° ; tout au plus va-t-elle quelquefois jusqu'à 35° et même un peu au-dessus dans certains cas particuliers. Aussi, un lait « rattrapé », riche en lactate de calcium, qui coagulerait à l'ébullition, peut rester homogène, stable, à 40° et *a fortiori* au-dessous.

Si l'acidité acquise est par trop forte, si, conséquemment, la quantité de lactate calcique qui se forme lors du « rattrapage » est trop grande, on peut obtenir à 40° une coagulation. En effet, dans l'association de ces deux facteurs : température et taux du sel calcique soluble, si l'on abaisse la température, il suffira d'élever la quantité de sels calciques ; si, par contre, on élève la température, le taux du sel calcique pourra être assez faible, mais dans un cas comme dans l'autre, il sera possible, en faisant varier les doses du sel, d'obtenir une précipitation (1) ; celle-ci ne sera pas toujours massive, et elle pourra se traduire par des flocons plus ou moins grossiers. Quoi qu'il en soit, l'emprésurage serait compromis, et le caillé obtenu ne pourrait être utilisé pour la fabrication des fromages.

Le « rattrapage » du lait doit être envisagé sous un autre angle. Nous avons vu un peu plus haut que le *B. Subtilis* sécrète des protéases qui s'attaquent à la caséine et qui se rapprochent plutôt du type trypsine que du type présure-pepsine. On sait aujourd'hui que le fait de coaguler le lait n'appartient pas à la présure seulement, mais que tout autre ferment protéolytique : trypsine, papaine, par exemple, peut coaguler le lait comme la présure, à condition que l'on opère dans des conditions de température et de réaction déterminées.

Le phénomène de la coagulation n'a pas objectivement la même apparence qu'avec la présure. Le stade de la coagulation peut être si rapide qu'il est difficilement perçu, parce que l'action digérante du ferment se développe rapidement, mais, somme toute, on peut admettre qu'à un moment donné, la caséine a été décomposée, et qu'il s'est fait de la paracaséine, laquelle, nous le savons, est plus sensible aux sels de calcium et précipite plus facilement en leur présence que la caséine. Aussi est-il logique de concevoir, malgré l'ignorance où nous sommes du

(1) Voir la thèse de l'un de nous (Ch. P.), (loc. cit.), chapitre VIII, p. 290.

jeu des associations microbiennes si variées qui peuvent intervenir dans le lait, que des microbes protéolytiques comme le *B. Subtilis* aient pu à un moment donné se développer dans le lait abondamment au point de transformer, sinon tout, du moins une partie de la caséine en paracaséine. Par suite, si l'on ajoute dans ce lait un excès de sel de calcium soluble, on facilite la précipitation de la paracaséine sous forme de paracaséinate calcique.

Le « rattrapage » d'un lait acide, mais dans lequel s'est développé à un certain moment des ferments protéolytiques du genre du *B. Subtilis*, peut donc conduire à la formation d'un coagulum massif ou en flocons, alors même que l'hyperacidité que l'on veut neutraliser n'est pas considérable. Toute la question est là, et selon que l'acidité acquise est accompagnée ou non d'un commencement de protéolyse, le « rattrapage » du lait par les sels calciques affecte pour un même degré d'acidité des aspects différents.

Toutes ces considérations nous ont amenés à entreprendre certaines expériences dans le détail desquelles nous allons maintenant entrer.

Nous tenons à remercier Mlle G. MARTIN, assistante à notre laboratoire, pour l'aide qu'elle nous a donnée dans ces recherches.

ACTION STIMULANTE DU *B. SUBTILIS* SUR LE *STREPTOCOCCUS LACTICUS*. — Le *B. Subtilis* a été isolé par nous d'herbes fraîches et le *Str. Lacticus* d'un lait de commerce.

Nous avons travaillé sur du lait stérilisé à 110° pendant 25 minutes. Nous suivons la marche de son acidité par titration avec la soude DORNIC et aussi par potentiométrie.

Dans toutes nos expériences, nous avons associé, en effet, la détermination de l'acidité actuelle et de l'acidité potentielle.

Des échantillons de lait stérilisé ont étéensemencés avec :

1° Le *B. Subtilis* seul ;

2° Le *Str. Lacticus* seul ;

3° Un mélange de *B. Subtilis* et de *Str. Lacticus*

Les ensemencements ont été effectués de très bonne heure en arrivant dès 8 heures au laboratoire, de façon à suivre dans la journée la marche de l'acidité, notamment sur les flacons ensemencés de ferment lactique, seul ou associé.

Nous avons tenu également à voir quel était l'aspect de la coagulation. On sait que lorsqu'on n'agit pas le lait et que celui-ci coagule sous l'action du développement progressif des ferments lactiques, il se fait une prise en masse.

Avec le *B. Subtilis*, nous obtiendrons également une coagulation en masse, un gel, parce que ce microbe sécrète des diastases protéolytiques qui engendrent la formation de paracaséine, laquelle précipitera

sous la forme de paracaseinate calcique, mais alors que le gel lactique se fait rapidement, le gel dû au *B. Subtilis* est tardif.

Lesensemencements, soit de *Str. Lacticus* seul, soit de *B. Subtilis* seul, soit d'un mélange des deux, sont additionnés de présure, et on les compare avec le lait stérilisé témoin qui, lui, n'a été l'objet d'aucun ensemencement.

Les laits ensemencés dans les conditions ci-dessus ont été également « rattrapés » lorsqu'il était nécessaire, ce qui n'est le cas que lorsqu'il y a des ferments lactiques. Le *B. Subtilis*, en effet, lorsqu'il se développe dans le lait, n'y forme pas d'acide ; au contraire, il fait marcher le lait vers l'alcalinité.

Action protéolytique du *B. Subtilis*. — EXPÉRIENCE I. — 3 décembre 1928.

50 cm³ de lait stérilisé sont ensemencés avec 2 cm³ de culture de *B. Subtilis* dans le lait. Le lait témoin a l'acidité suivante :

Acidité titrable en degrés D. : 19° 5.

Acidité actuelle : pH = 6,81.

Le lendemain, 4 décembre, nous avons :

Acidité titrable : 19° D.

Acidité actuelle : pH = 6,75.

Il y a donc une légère marche vers l'acidité, mais elle va se stabiliser pour se transformer ensuite en une marche vers l'alcalinité.

La culture dans le lait qui date de 24 heures est soumise aux réactions suivantes :

1° *Addition de CaCl²* dans la proportion de 1 gr. 11 au titre (N/100). Nous employons une solution de CaCl² cristallisé à 48 gr. 84 au litre, si bien que la dilution du lait est insignifiante.

Le lait ensemencé du *B. Subtilis* pas plus que le lait témoin ne coagulent après cette addition de CaCl² lorsqu'on porte à 40°, température que nous n'avons jamais dépassée, étant donné l'objet de notre travail, qui vise surtout le « rattrapage » possible du lait dans l'industrie fromagère.

2° *Action de la présure.* — Le lait témoin au bout de 60 minutes coagule en donnant un caillé extrêmement mou. Le lait ensemencé de *B. Subtilis* coagule déjà au bout de 30 minutes.

Il semble donc que l'action de la présure s'est trouvée facilitée par l'action d'un ferment protéolytique déversé dans le lait par le B. Subtilis dans les premières vingt-quatre heures.

5 décembre. — Acidité en degrés D. : 19 ; pH = 6,75.

Ce sont les mêmes déterminations qu'hier, ce qui répond à la stabilisation que nous avons signalée tout à l'heure.

Addition de CaCl² dans les mêmes proportions que ci-dessus, N/100 au litre. Témoin : aucune coagulation.

Le lait ensemencé de *B. Subtilis* : légère coagulation au bout de 3 minutes ; nous avons un caillé extrêmement mou. Ce caillé est fait, à n'en pas douter, de paracaseinate calcique.

La présure qui faisait prendre le lait en gel hier en 30 minutes n'aboutit à un coagulum ce jour qu'en 45 minutes : III gouttes de présure Fabre diluée au 1/10 ont été versées dans 10 cm³ de lait. Il y a donc un retard notable à constater dont nous allons peut-être trouver l'explication les jours suivants.

6 décembre. — Acidité en degrés D. : 12° ; pH = 7,28.

Entre le 5 et le 6 décembre, donc les dernières vingt-quatre heures, nous avons eu une marche nette vers l'alcalinité.

Addition de CaCl² à 40° toujours.

Le témoin ne donne rien, mais le lait additionné de *B. Subtilis* donne une coagulation rapide en gros flocons qui se soudent très vite pour former un caillé consistant. La formation de paracaseïne s'est donc accentuée depuis hier.

Addition de présure. — Alors qu'avant-hier nous obtenions une coagulation en 30 minutes, hier en 45 minutes, aujourd'hui il n'y a rien au bout de ce temps. En revenant de déjeuner, deux heures après, on constate qu'une coagulation s'est faite, mais le caillé est très mou ; le lait semble visqueux, sans cohésion. Remarquons que le lait est ici nettement alcalin ; pH = 7,28, et que nous ne sommes pas loin de la limite de l'action de la présure (pH = 7,40-7,50).

Nous recommençons une nouvelle expérience sur le laitensemencé de *B. Subtilis*.

EXPÉRIENCE II. — Le lait témoin stérilisé à 115° pendant 25 minutes a un pH = 6,81, et une acidité titrable de 18° 5 D.

1 cm³ de culture de *B. Subtilis* dans le lait est versé dans les 50 cm³ de chaque ballon.

Comme les modifications engendrées par les cultures de *B. Subtilis* sont surtout notables à partir de trois jours, nous n'examinons que le 7 le lait qui avait étéensemencé le 3.

Degrés D. : 12 ; pH = 7,28.

Addition de CaCl². — Au B.-M. à 40°. Coagulation instantanée et caillé ferme.

Addition de présure. — La coagulation se produit en 12 minutes, mais c'est une masse visqueuse que l'on obtient et on dirait que le lait s'est épaissi pour donner une gelée fluide plutôt qu'il ne s'est vraiment pris en masse.

Le lait témoin ne coagule ni par la présure, ni par le chlorure de calcium. Notons qu'il a été chauffé à 115°, alors que dans la série précédente, il n'avait été chauffé qu'à 110°.

EXPÉRIENCE III. — Les flacons ont étéensemencés le 6 décembre; ils ont été examinés le 8.

Le témoin a 18° D. et son pH = 6,80.

Le 8 décembre : Acidité D. : 15° 6 ; pH = 7,10.

Nous voyons donc déjà qu'au bout de 48 heures la réaction du lait a évolué vers l'alcalinité.

Addition de CaCl². — Lait témoin : rien. Laitensemencé : épaississement et apparition de petits flocons.

Addition de présure. — Le lait ne coagule que très tardivement ; ce n'est qu'au bout de 18 heures qu'on a pu constater la formation d'une gelée très diffluente.

9 décembre : Acidité D. : 13° ; pH = 7,20.

Addition de CaCl₂. — Lait ensemencé : floculation en petits grumeaux presque instantanée.

Addition de présure. — Même résultat qu'hier.

10 décembre : Acidité D. : 12° 5 ; pH = 7,33.

Addition de CaCl₂. — Floculation rapide en petits grumeaux.

Présure. — Epaissement tardif.

11 décembre, soit 5 jours après l'ensemencement initial : Degré D. : 12° ; pH = 7,43.

Addition de CaCl₂. — Floculation rapide.

Présure. — Comme la veille.

12 décembre : On constate dans les flacons conservés à l'étude un commencement de coagulation. Sous l'action des protéases du *B. Subtilis*, il s'est formé suffisamment de paracaséine pour qu'on obtienne un caillé.

Acidité D. : 10° 5 ; pH = 7,64.

Bien qu'il n'y ait qu'une coagulation, très molle à la vérité, on ajoute du CaCl₂ et on a une prise en masse presque immédiate.

13 décembre : Le lait est coagulé, le caillé commence même à se digérer. Il nage dans un liquide qu'il a laissé exsuder, coloré en jaune. Le pH n'a pu être pris avec l'électrode à quinhydrone, le lait étant devenu trop alcalin. On a procédé à une titrimétrie sur la liqueur après rupture du caillé mou, ce qui a été facile. Le degré D. trouvé est de 10.

Association du *B. Subtilis* et des ferments lactiques. — Connaissant le développement du *B. Subtilis* dans le lait, nous avons procédé maintenant à l'association du *B. Subtilis* et du *Str. Lacticus*. Nous n'avons pas toujours opéré comme M. S. Marshall, qui recourait à l'ensemencement simultané. Nous n'avons parfois ajouté les ferments lactiques qu'après que le *B. Subtilis* s'était développé dans le lait suffisamment longtemps.

EXPÉRIENCE IV. — 13 décembre : A 50 cm³ de lait stérilisé, nous ajoutons XXX gouttes de culture de 24 heures de *B. Subtilis* dans le lait, et l'on porte à l'étuve à 37°.

14 décembre : Dans le ballon ensemencé avec du *B. Subtilis* nous ajoutons XXX gouttes de cultures pures de ferments lactiques, et dans un deuxième ballon témoin, nous ajoutons la même quantité de ferments lactiques, qui s'y trouve par conséquent seule. Ces ensemencements lactiques ont été effectués à 9 heures.

Premier examen à 11 heures.

| | Degrés D. | pH |
|--|-----------|------|
| Lait + <i>Subtilis</i> + lactiques | 20° | 6,75 |
| Lait + lactiques seuls | 20° | 6,75 |

Comme le lait stérilisé non ensemencé a la même placidité 20° D. et pH = 6,75, il n'y a donc pas de changement au bout de deux heures.

Second examen à 15 heures 30, soit 6 heures 30 après l'ensemencement de ce jour.

Le ballon contenant le *B. Subtilis* est coagulé ; le caillé est mou. Celui qui ne renferme que les lactiques purs ne l'est pas.

| | Degrés D. | pH |
|--|-----------|------|
| Lait + <i>Subtilis</i> + lactiques | 62° | 5,39 |
| Lait + lactiquesseuls | 38° | 5,82 |

Nous voyons par cette simple expérience combien le *B. Subtilis* a favorisé le développement des lactiques, grâce à un ensemencement antérieur d'une durée de 24 heures.

EXPÉRIENCE V. — 28 novembre 1928 : A 9 heures, on ensemence :

1° Un ballon contenant 50 cm³ du lait stérilisé avec X gouttes d'une culture pure de ferments lactiques dans ce lait ;

2° Un ballon contenant 50 cm³ de lait avec X gouttes d'une culture de *B. Subtilis* en bouillon ;

3° Un même ballon avec X gouttes de chacune des deux cultures.

On porte à l'étuve à 37°.

Premier examen à 11 heures, soit 2 heures après les ensemencements.

| | Degrés D. | pH |
|-------------------------------|-----------|------|
| Lactiquesseuls | 20° | 6,75 |
| <i>B. Subtilis</i> seul | 20° | 6,75 |
| Mélange | 20° | 6,75 |

Deuxième examen à 15 heures, soit 6 heures après l'ensemencement.

| | Degrés D. | pH |
|-------------------------------|-----------|------|
| Lactiquesseuls | 22° | 6,63 |
| <i>B. Subtilis</i> seul | 20° | 6,75 |
| Mélange | 23° | 6,57 |

Déjà, au bout de six heures, nous pouvons constater la stimulation apportée aux ferments lactiques par le *B. Subtilis*.

Nous recommencerons ces essais en ajoutant une plus forte dose des microbes en question aux ballons ci-dessus.

29 novembre : Les laits ensemencés de lactiques, soit seuls, soit mélangés avec du *B. Subtilis* sont coagulés en un gel assez ferme.

| | Degrés D. | pH |
|-------------------------------|-----------|------|
| Ferments lactiquesseuls | 57° | 4,88 |
| <i>Subtilis</i> | 20° | 6,75 |
| Mélange | 45° | 5,50 |

EXPÉRIENCE VI. — 29 novembre : Comme nous le disions plus haut, à 50 cm³ de lait, nous avons ajouté, non plus X gouttes de culture, mais 2 cm³, ce qui fait une dose environ quatre fois plus forte. L'ensemencement a été fait à 9 heures.

| Premier examen, à 15 heures, soit 6 heures après: | Degrés D. | pH |
|---|-----------|------|
| Lactiques seuls | 57° | 4,88 |
| <i>Subtilis</i> seul | 20° | 6,75 |
| Mélange | 42° | 5,73 |

On porte 10 cm³ de chaque échantillon au B.-M. à 40°. On a une coagulation rapide pour les tubes contenant les ferments lactiques seuls, plus rapide encore avec le mélange dont le coagulum est plus ferme. Le tube contenant le *B. Subtilis* seul ne se coagule pas.

EXPÉRIENCE VII. — 30 novembre : On aensemencé à 9 heures 30, avec 2 cm³ de culture. Le ballon a été retiré de l'étuve à 12 heures, soit 2 heures 30 après et laissé au laboratoire, où son examen n'a été fait qu'à 14 heures, soit 4 heures 30 après.

| | Degrés D. | pH |
|--------------------------------|-----------|------|
| Ferments lactiques seuls | 30° | 6,39 |
| <i>Subtilis</i> seul | 20° | 6,75 |
| Mélange | 32° | 6,33 |

On porte à 40°. 10 cm³ de lait pour chaque essai. On n'a pas de coagulation avec les trois tubes. On ajoute 3 gouttes de présure FABRE diluée au dixième.

Ferments lactiques. — Coagulation en 4 minutes.

Subtilis seul. — Coagulation en 30 minutes.

Mélange. — Coagulation en 1 minute 05.

Les caillés dans les tubes 1 et 3 sont fermes ; au contraire, le caillé du *Subtilis* seul est beaucoup plus mou, mais dans l'un comme dans l'autre les sérums qui s'écoulent sont clairs.

Le lait témoin nonensemencé ne coagulait par la présure que très lentement, après plus d'une heure, et le caillé obtenu est très mou ; il est plutôt formé d'une soudure incomplète de petits flocons.

LE « RATTRAPAGE » DES LAITS ACIDES. — Nous allons nous employer à déterminer jusqu'à quel degré D. on peut aller pour « rattraper » le lait, c'est-à-dire pour obtenir une liqueur homogène, sans flocons, et qui devra rester telle lorsqu'on la portera au maximum à 40°, température qui, avons-nous dit, n'est pour ainsi dire jamais réalisée pendant l'emprésurage.

Pour cela, nous comparerons des laits de même origine, mais d'acidités différentes. Tantôt, nous aurons laissé le lait s'acidifier lui-même, tantôt, au contraire, nous aurons provoqué en lui une acidité par un apport déterminé d'acide lactique. Dans l'un et l'autre cas, nous reviendrons avec l'aide de la chaux à l'acidité première par étapes et nous déterminerons le point exact où la température de 40° ne déterminera pas le moindre trouble visible, lequel se traduirait d'abord par des petits flocons dans la liqueur.

EXPÉRIENCE VIII. — Un lait qui par l'acidification naturelle a été porté à 30° D. est additionné de 0 gr. 300 de chaux pour 1.000. Pour cela, on malaxe la quantité de chaux nécessaire dans un mortier avec une petite quantité de lait, et l'on fait une bouillie que l'on dilue ensuite petit à petit avec le reste du lait nécessaire. On abaisse ainsi son acidité à 20° D.

La charge en lactate de calcium est sensiblement de 1 gr. 25. Dès la température ordinaire, nous constatons une fine précipitation qui s'exagère à 40°.

Le lait est chauffé successivement à 25°, 40° et au B.-M. bouillant.

Chauffage à 25°. — Le lait original à 30° D., non « rattrapé », est chauffé à 25° pendant une demi-heure. Sur les parois, il n'y a pas de dépôt, mais après un repos de quelques heures, on remarque un petit caillé au fond du tube.

Le même lait « rattrapé » par la chaux et ramené à 20° D. s'altère davantage

par chauffage à 25°. Par transvasement, on constate un léger dépôt sur les parois et au bout de deux heures, par le repos, il y a au fond du tube un dépôt abondant qui affecte l'aspect d'un caillé lisse, mou sans doute, mais cependant assez cohérent.

Chauffage à 40°. — Qu'il s'agisse du lait acide ou du lait « rattrapé », on a les mêmes constatations que ci-dessus.

Chauffage à 100°. — Le lait acide donne un caillé mou, cohérent, occupant presque tout le volume du liquide.

Le même lait « rattrapé » par la chaux est bien moins altéré ; le dépôt est moins considérable.

Conclusion. — Nous constatons qu'un lait de 30° D. est trop acide pour pouvoir être rattrapé par la chaux. Nous n'en voyons d'ailleurs pas la nécessité, puisque lorsqu'on le chauffe à 40°, on ne note pas d'altération, si bien qu'on peut l'emprésurer sans traitement préalable. Le seul intérêt du « rattrapage » se comprendrait si le lait devait être porté à 100°, mais ceci n'entre pas en considération.

EXPÉRIENCE IX. — Elle a été faite sur un lait d'autoacidification de 24° D. que l'on ramène par malaxage avec de la chaux à 18° D.

Chauffage à 40°. — Lait acide : aucune altération. Lait « rattrapé » : le liquide reste presque homogène, tout au plus observe-t-on sur les parois de fins flocons.

Chauffage à 100°. — Lait acide 24° D. n'est pas altéré. Lait 18° D. « rattrapé » par la chaux reste également homogène.

Les conclusions sont les mêmes que pour l'expérience précédente. Un lait à 24° D. peut être, par addition de chaux, ramené à 19° sans altération sensible. On n'en voit pas la nécessité du moment qu'un lait acide de 20° D. par chauffage à 40° n'est pas altéré.

Nous avons emprésuré le lait d'acidité 24° D. et le même lait « rattrapé » par la chaux et n'ayant plus que 19° D. avec la même quantité de présure. Le premier coagule en 3 minutes, le second en 3 minutes 20 secondes.

Ces temps sont presque semblables, bien que les deux laits soient de types différents. En effet, le premier est nettement acide, 24° D., et le second d'acidité normale, 19° D. Mais il faut noter que celui-ci renferme une plus grande quantité de sels calciques sous forme de lactate de calcium, et dans ces conditions, on peut dire que l'excès de sels calciques, avec le degré d'acidité moindre, a joué par rapport au temps de coagulation sensiblement le même rôle que l'acidité plus exagérée du premier lait, qui lui ne renferme pas un excès de chaux soluble.

Ces considérations ne valent que pour ce cas particulier, parce que tout dépend ici de la quantité de chaux soluble que le « rattrapage » a introduit dans le lait, et nous trouverons dans une expérience ultérieure que si cette quantité de chaux est plus faible, autrement dit, si nous n'avons « rattrapé » qu'un petit nombre de degrés d'acidité, nous pouvons avoir une différence dans les temps de coagulation des deux laits, le lait acide et le lait « rattrapé », plutôt grande, et toujours au

bénéfice du lait acide qui coagulera plus rapidement que le lait « rat-trapé ».

EXPÉRIENCE X. — Un lait de 20° d'acidité D est acidifié avec de l'acide lactique pour l'amener à 22° D., puis on le ramène à 19° D. par addition de chaux.

A la température ordinaire, les deux laits : acidifié, puis « rattrapé », sont homogènes, et ils le restent après chauffage à 40°.

Par chauffage à 100°, ces laits ne paraissent pas non plus altérés, mais si l'on examine de près, on constate que le lait qui avait été d'abord acidifié à 22° D., puis « rattrapé » pour être ramené à 19° D., est légèrement altéré et, au fond du tube, on a une toute petite masse coagulée.

Nous concluons que la limite de sensibilité d'un lait acide pouvant être « rattrapé » par la chaux, c'est-à-dire ramené à un degré D. normal de 18° D., se trouve être comprise entre 22° D. et 24° D. C'est pour 22° D., qu'un lait neutralisé par la chaux et ramené à 18° D. ne précipite pas à 40°, tandis qu'un lait de 24° D. ramené à 18° D donne une fine floculation lorsqu'on le transvase.

Nous avons dit plus haut que le « rattrapage » par la soude s'effectuait surtout pour les laits de consommation courante. Toutefois, il y avait intérêt à faire l'expérience dans des conditions particulièrement sévères.

EXPÉRIENCE XI. — A 250 cm³ de lait, nous ajoutons de l'acide lactique. Le lait déjà acide ayant 25° D. reçoit 4 cm³ d'acide lactique à 8 gr. 85 %, et on amène ainsi son acidité à 47° D.

Sur une partie de ce lait, on ajoute à nouveau 2 cm³ de soude normale pour le ramener ainsi à 25° D.

A la température ordinaire, l'aspect de ces laits n'est nullement modifié.

Chauffage à 40°. — Lait 47° D. : n'est pas altéré, et on n'a pas de coagulation.

Lait « rattrapé » par la soude. Il est altéré, des petits flocons se déposent au fond du tube.

Emprésurage.

Lait 47° D. : 25 secondes. Caillé ferme.

Lait rattrapé de 25° D. : 45 secondes. Caillé un peu plus mou, fragile, alors que le précédent était compact et solide.

On voit qu'un lait ayant 47° D. d'acidité n'est pas altéré par chauffage à 40°. Si on le porte au B.-M. bouillant, il coagule très rapidement.

Nous avons recommencé ces expériences avec des laits stérilisés que nous ensemençons de ferments lactiques.

EXPÉRIENCE XII. — Un lait ayant une acidité D. de 20° et un pH = 6,75 est additionné de ferments lactiques. Trois heures après son acidité D. est de 22° D. son pH = 6,63.

On essaye le « rattrapage » de ce lait légèrement acide avec de l'eau de chaux, et on le ramène à 18° 5, son acidité initiale. Le « rattrapage » avec de la chaux ne modifie en rien l'aspect du lait quand on le porte à 40°.

Emprésurage. — Lait acide à 22° D. Coagulation en 7 minutes. Lait « rattrapé » : coagulation en 15 minutes. Lait témoin stérilisé : en 60 minutes.

Les caillés des deux premiers laits sont très fermes, celui du témoin est mou. 50 cm³ de lait sontensemencés à 9 heures 30 avec 1 cm³ de culture de ferments lactiques.

A 2 heures, soit 4 heures 1/2, on a : Degré D. : 28 ; pH = 6,22.

On ajoute la quantité de chaux nécessaire pour obtenir : Degré D. 19 ; pH = 6,75.

Si on porte au B.-M. à 40°, il n'y a pas d'altération sensible dans les deux laits.

Emprésurés, le lait acide coagule en 1 min. 30 sec., le lait « rattrapé » en 7 minutes. Les caillés ne sont pas très fermes, celui du second est plus mou que le premier.

Ce qu'il y a d'intéressant dans ces expériences, c'est qu'elles ont porté sur du lait stérilisé qui est très paresseux vis-à-vis de la présure, puisqu'il ne coagule qu'au bout de 1 heure en donnant un coagulum plutôt visqueux.

Si nous acidifions ce lait par un développement de ferments lactiques et que nous revenions à l'acidité originelle, nous voyons ce lait coaguler très rapidement par la présure. C'est que, en somme, nous y avons introduit par acidification et neutralisation ultérieure une certaine quantité de sels solubles de calcium.

Si nous avons ajouté la même quantité de sels dans le lait témoin, c'est-à-dire le lait stérilisé nonensemencé de ferments lactiques, nous aurions eu une coagulation aussi rapide.

Le lait « rattrapé », moins acide que le lait acidifié, mais plus riche en chaux, coagule toutefois plus tardivement. C'est donc que nous pouvons conclure que les ions H favorisent davantage l' emprésurage que les ions Ca.

Conclusions. — 1° Le *B. Subtilis* favorise la fermentation lactique. Un laitensemencé au préalable de *B. Subtilis*, puis de ferments lactiques, de même qu'un laitensemencé simultanément de *B. Subtilis* et de ferments lactiques, s'acidifie plus rapidement qu'un lait qui ne recevrait que des ferments lactiques.

2° Le *B. Subtilis*, par ses protéases, attaque la caséine aux dépens de laquelle il forme transitoirement de la paracaséine, qu'il dissocie ensuite en morceaux plus petits. Les laitsensemencés de *B. Subtilis*, à un moment donné, précipitent par addition de chlorure de calcium.

3° Le « rattrapé » des laits par la chaux ou la magnésie est une opération assez limitée par le taux de l'acidité acquise. Elle ne doit être tentée que pour des hyperacidités assez faibles. Pour des hyperacidités marquées, elle peut engendrer au sein du lait une floculation que la température d' emprésurage facilite et, dans ces conditions, on obtiendrait des coagulations labiques mal venues et qui conduiraient à l'obtention de produits de qualité inférieure.