# Influence de la température de réfrigération du lait sur la protéolyse et l'amertume du lait UHT au cours de son stockage

X. Dousset, M. Demaimay, C. Ravaud, A. Levesque, X. Pinet, Y. Kergo

▶ **To cite this version:**

X. Dousset, M. Demaimay, C. Ravaud, A. Levesque, X. Pinet, et al.. Influence de la température de réfrigération du lait sur la protéolyse et l'amertume du lait UHT au cours de son stockage. Le Lait, 1988, 68 (2), pp.143-156. hal-00929122

**HAL Id: hal-00929122**
**https://hal.science/hal-00929122**

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.

*Le Lait*, 1988, *68* (2), 143-156

# Influence de la température de réfrigération du lait sur la protéolyse et l'amertume du lait UHT au cours de son stockage

X. DOUSSET *, M. DEMAIMAY *, C. RAVAUD *, A. LEVESQUE *, X. PINET **, Y. KERGO ***

* *ENITIAA, Domaine de la Géraudière, 44072 Nantes Cedex 03, France*
** *CANA, 44150 Ancenis, France*
*** *COLARENA, 44750 Campbon, France*

## Résumé

Deux essais de réfrigération à 3 °C et 8 °C de lait de mélange de 48 heures ont été réalisés. Ces laits ont ensuite subi un traitement UHT indirect de 4 secondes à 140 °C et ont été stockés à 30 °C et 55 °C. Leur activité protéolytique a été déterminée par la méthode au TNBS (trinitrobenzène sulfonate) ainsi que leur amertume par analyse sensorielle pendant une durée de 3 mois au cours du stockage.

Après deux jours de réfrigération à 3 °C (1er essai), la flore psychrotrophe et l'activité protéolytique du lait cru restent faibles. Les laits UHT produits à partir de ce lot se conservent bien. Après deux jours de réfrigération à 8 °C (2e essai), le même lait présente une flore psychrotrophe et une activité protéolytique élevées ($8 \cdot 10^5$ cellules/ml) et 0,57 Δμ moles de glycine/ml). Après 100 jours de conservation à 30 °C, les packs de lait UHT présentent une légère amertume et une activité protéolytique légèrement supérieure à 0,1 Δμ mole glycine/ml.

Un troisième essai a été effectué sur un lait d'une traite très propre ($2 \cdot 10^4$ cellules/ml) ensemencé à 0,01 % avec une souche de *Pseudomonas fluorescens* 28 P 12 en début de phase stationnaire. Après deux jours de réfrigération à 8 °C, la flore psychrotrophe atteint $4 \cdot 10^6$ cellules ml et l'activité protéolytique s'accroît de manière considérable en 48 heures (de 0,32 à 1,0 Δμ mole glycine/ml). Cette augmentation très rapide peut s'expliquer par l'état physiologique de la souche. Après 15 jours de conservation, les laits UHT manifestent une très forte activité protéolytique (0,3 Δμ mole glycine/ml) et sont déstabilisés. L'hypothèse est formulée d'une renaturation rapide de la protéase de cette souche.

*Mots clés :* Protéolyse - Psychrotrophe - Lait UHT - Refroidissement du lait - Amertume.

---

Travail soutenu par le ministère de l'Agriculture (Direction de l'Alimentation).

## Summary

*Proteolysis and bitterness of HTST milk during storage as a consequence of refrigeration temperature of raw milk*

Two tests of refrigeration at different temperature levels (3 °C and 8 °C) were carried out on pooled raw milk kept less than 48 h. Then milks were sterilized by a process (4 sec at 140 °C) and stored at 30 °C and 55 °C during 100 days. During storage their proteolytic activity (TNBS test) and their bitterness (sensoric analysis) were determined.

After 2 days of refrigeration at 3 °C (1st test), psychrotrophic level and proteolytic activity were both very low. After 2 days of refrigeration at 8 °C (2nd test), high psychrotrophic level ($8 \cdot 10^5$ cells/ml) and high proteolytic activity (0.57 $\Delta\mu$ mole glycine/ml) were observed. In these conditions, HTST milk stored 100 days at 30 °C, gave little bitterness and a weak residual proteolytic activity of 0.1 $\Delta\mu$ mole glycine/ml).

The third test was carried out with a very clean single raw milk ($2 \cdot 10^4$ cells/ml) inoculated with 0.01 % cells/ml *Pseudomonas fluorescens* strain 28 P 12 in the beginning of his stationnary phase. After 2 days at 8 °C, psychrotroph cell number reaches $4 \cdot 10^6$ cells/ml and proteolytic activity a very high level (1.0 $\Delta\mu$ mole glycine/ml) in comparison with an initial level of 0.32 $\Delta\mu$ mole glycine/ml. Physiological state of the strain could explain this result. After two weeks, HTST milks present a very high residual proteolytic activity (0.3 $\Delta\mu$ mole glycine/ml) and are not stable. We can explain this result by the protease renaturation of this strain.


*Key words :* Proteolysis - Psychrotrophs - HTST milk - Cooling of milk - Bitterness.

## Introduction

La pratique courante de stocker le lait à basse température est à l'origine du développement des germes psychrotrophes (Cousin, 1982) et en particulier des *Pseudomonas fluorescens* (Blocquel et Veillet Poncet, 1980 ; Richard, 1983). Ces microorganismes sécrètent des protéases extracellulaires thermostables impliquées dans le phénomène de gélification (Law *et al.*, 1979) et d'amertume du lait UHT (Bengtsson *et al.*, 1973 ; Richardson et Newstead, 1979 ; Mc Kellar *et al.*, 1984). Ces enzymes sont très thermostables et résistent partiellement au traitement UHT de quelques secondes à 140°-150 °C (Adams *et al.*, 1975 ; Mottar *et al.*, 1979 ; Driessen, 1983 ; Patel *et al.*, 1986, Miranda et Gripon, 1986). Les travaux de Mottar *et al.* (1979, 1981) et de Mc Kellar (1981) ont montré qu'il existait une relation entre protéolyse et durée de conservation du lait UHT. Mottar *et al.* (1984) ont étudié l'influence du temps de conservation du lait sous réfrigération sur la conservabilité du lait UHT. Gillis *et al.* (1985) ont déterminé le rôle du niveau de contamination en psychrotrophes du lait cru sur l'état de protéolyse et la qualité sensorielle du lait UHT.

Pour notre part, nous avons recherché au cours de cette étude à connaître et à mettre en relation l'influence de la température de réfrigération du lait à l'usine sur le développement des psychrotrophes, le niveau de protéolyse et

l'amertume du lait UHT au cours de sa conservation à 30 °C et à 55 °C. Cette dernière condition de stockage peut en effet se présenter quelquefois pour les produits destinés à l'exportation.

## I. Matériel et méthodes

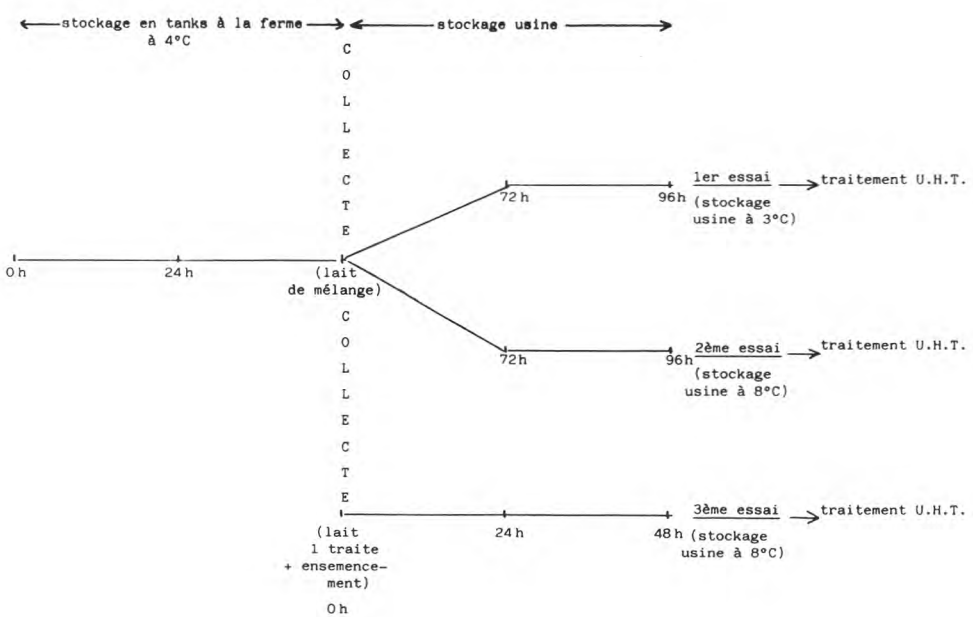
### A. *Echantillons et traitement de stérilisation*

Les essais ont été menés à l'échelle industrielle sur 2 000 litres de lait de qualité A (inférieur à 100 000 germes/ml). Les laits ont subi les traitements suivants (schéma n° 1) :

*1er essai :* Lait de mélange de 48 heures stocké à 3 °C.

*2e essai :* Lait de mélange de 48 heures stocké 48 heures à 8 °C. Nous avons choisi une température de stockage plus élevée de façon à obtenir un niveau de protéolyse significativement plus important.

*3e essai :* Cette expérimentation est réalisée afin de disposer d'un lait à niveau de contamination très élevé. Dans ce but nous avons ajouté 200 ml d'une préculture de *Pseudomonas fluorescens* 28 P 12 sur milieu TSB en début de phase stationnaire dans les 2 000 litres de lait contenus dans le tank. La population initiale de ce lait de producteur était de $2 \cdot 10^4$ cellules/ml. Après adjonction de cette culture, nous avons obtenu une population de $10^5$ cellules/ml de manière à assurer la dominance de la souche *Pseudomonas fluorescens* 28 P 12. Ce lait est maintenu 48 heures à 8 °C.



Ces laits après stockage en tanks réfrigérés et agités (15 minutes/heure) ont subi un traitement UHT par la méthode indirecte. Le cycle de stérilisation réalisé sur l'appareil APV 8 000 de débit 8 200 l/h a été le suivant :

| | | |
|---|---|---|
| Préchauffage | : | 10 secondes pour atteindre la température de 100 °C |
| Chauffage | : | 24 secondes pour atteindre la température de 122 °C |
| | : | 24 secondes pour atteindre la température de 140 °C |
| Chambrage | : | 4 secondes dans le chambreur à 140 °C |
| Prérefroidissement | : | 28 secondes pour atteindre la température de 114 °C |
| Refroidissement | : | 13 secondes pour atteindre la température de 25 °C |

Le conditionnement de ces laits stérilisés a été réalisé de manière aseptique sur machine tétrapack. Les packs ont été répartis dans des étuves régulées à 30 °C et 55 °C.

### B. *Détermination de l'état de protéolyse et de l'activité protéolytique par la méthode au TNBS*

Les groupes aminés libres sont déterminés par la méthode FIELDS (1971) modifiée par SPADARO *et al.* (1979). A 2 ml de lait, on ajoute 4 ml d'acide trichloracétique (TCA) 12 %, on conserve 20 minutes à 25 °C puis on filtre. 0,2 ml de surnageant est mélangé avec 2 ml de borate de potassium 1 M (pH = 9,2) et 0,8 ml d'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) 5 mM et incubé à l'obscurité à 25 °C pendant 30 minutes. On ajoute alors 18 mM de sulfite contenu dans une solution phosphate monosodique 18 mM. On détermine la densité optique (DO) à 420 nm.

La gamme étalon est faite à partir d'une solution de glycine (1 M) de 0,2 à 1,2 µ mole/ml par pas de 0,2 sans filtration. On dresse ainsi la courbe : (DO) en fonction de la concentration en glycine et on détermine ainsi l'état de protéolyse (EP) exprimé en µ mole de glycine.

Pour obtenir l'activité protéolytique (AP), on dose l'état de protéolyse du lait après incubation à 37 °C pendant 20 heures de 9 ml de lait en présence de 1 ml de solution d'azoture de sodium à 5 % et de pénicilline G 1000 microgrammes/ml. Par différence entre l'état de protéolyse avant et après incubation, on obtient l'activité protéolytique exprimée en variation de micromole de glycine par ml ($\Delta\mu$ mole/glycine/ml).

Ces mesures ont été réalisées sur le lait sous réfrigération et sur le lait UHT au cours de sa conservation.

### C. *Analyse sensorielle*

Quinze juges sélectionnés ont été formés préalablement pour percevoir la saveur amère d'un lait. On a choisi comme référence une solution de leucine à 30 mM (acide aminé amer) selon les résultats de Mc KELLAR *et al.* (1984). Cette référence a été positionnée à 5 cm sur l'échelle de note de 15 cm (LARMOND, 1977).

Les dégustations de lait UHT ont été réalisées après 15, 40, 70 et 100 jours de stockage à 30 et 55 °C. Les résultats ont été analysés par la méthode d'analyse de la variance et le test de Student étendu.

### D. *Analyses microbiologiques*

Les flores totales et psychrotrophes ont été déterminées sur les laits crus selon les méthodes standards d'examen des produits laitiers (MARTH, 1978).

L'identification de la flore psychrotrophe des laits avant traitement UHT a été réalisée par la méthode API 2ONE. Une trentaine de colonies ont été identifiées par boîte.

Les contrôles de stérilité des laits UHT ont été réalisés.

## II. Résultats

### A. *Evolution des flores totales et psychrotrophes du lait au cours de sa conservation à basse température, identification de la flore psychrotrophe*

Les figures 1 et 2 présentent l'évolution de ces flores au cours de sa conservation à basse température. Le développement est beaucoup plus rapide à 8 °C qu'à 3 °C. Le nombre de bactéries totales passe de $4{,}5 \cdot 10^4$ à $8 \cdot 10^4$ cellules/ml après 48 heures de conservation à 3 °C et à $10^6$ cellules/ml après 48 heures à 8 °C. On peut calculer avec les résultats du développement de la flore psychrotrophe le temps de génération correspondant. Celui-ci est égal à environ 36 heures à 3 °C et 8 heures à 8 °C dans notre expérimentation. Pour l'essai ensemencé, ce temps est encore plus court puisqu'il est de 7 heures.

La proportion de psychrotrophes du lait augmente au cours de la réfrigération puisqu'elle passe respectivement pour l'essai non ensemencé à 8 °C de 40 à 80 % environ et pour l'essai à 3 °C de 20 à 70 % environ.

Les identifications des germes psychrotrophes ont été réalisées sur galerie API 2ONE sur les laits conservés au froid avant traitement UHT. Les résultats sont les suivants :

- 1$^{er}$ essai : lait de mélange conservé 48 heures à 3 °C
  - 70 % *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas putida*
  - 30 % autres bactéries
- 2$^{e}$ essai : lait de mélange conservé 48 heures à 8 °C
  - 80 % *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas putida*
  - 13 % autres gram−
  - 7 % gram+
- 3$^{e}$ essai : lait ensemencé conservé 48 heures à 8 °C
  - 100 % *Pseudomonas fluorescens*

### B. *Evolution de l'état de protéolyse et de l'activité protéolytique du lait avant et après traitement UHT au cours de son stockage*

Les activités protéolytiques observées dans le lait cru et dans le lait UHT après stockage à 30 °C et 55 °C sont présentées sur les figures 3, 4 et 5.

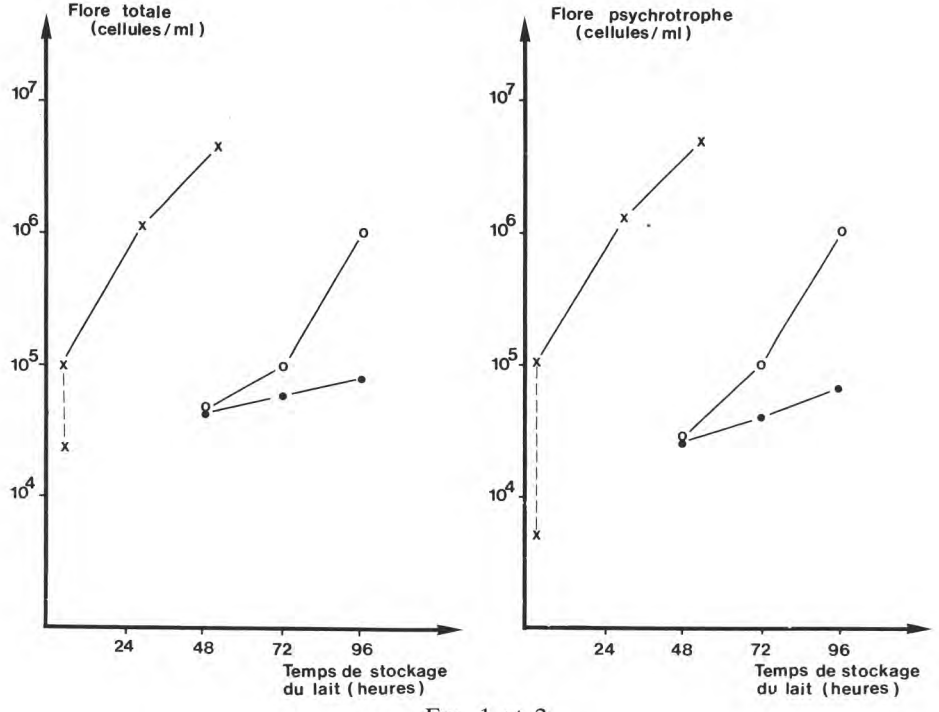



FIG. 1 et 2

*Evolution de la population microbienne de lait cru en fonction du temps de stockage. Microbial development during the cooled storage of milk.*

● *lait conservé à 3 °C*
○ *lait conservé à 8 °C*
★ *lait ensemencé conservé à 8 °C*

● *milk stored at 3 °C*
○ *milk stored at 8 °C*
★ *inoculated milk stored at 8 °C*

1. *Activité protéolytique du lait cru*

L'activité protéolytique moyenne des laits crus de mélange de qualité A a été déterminée sur 50 échantillons. Celle-ci est égale à 0,41 $\Delta\mu$ mole glycine/ml avec un intervalle de confiance de 0,04 ce qui signifie que la fourchette de valeurs est située entre 0,37 et 0,45 $\Delta\mu$ mole glycine/ml au seuil de confiance de 1 %.

La figure 3 montre l'évolution de l'activité protéolytique au froid en cours du temps pour les trois essais comportant une contamination variable en *Pseudomonas* du groupe *fluorescens*. En fin de réfrigération :

- pour une population de $4 \cdot 10^6$ psychrotrophes (3$^e$ essai), on obtient une AP finale de 1,0 $\Delta\mu$ mole glycine/ml ;
- pour une population de $8 \cdot 10^5$ psychrotrophes (2$^e$ essai), on obtient une AP finale de 0,57 $\Delta\mu$ mole glycine/ml ;
- pour une population de $6 \cdot 10^4$ psychrotrophes (1$^{er}$ essai), on obtient une AP finale de 0,39 $\Delta\mu$ mole glycine/ml).

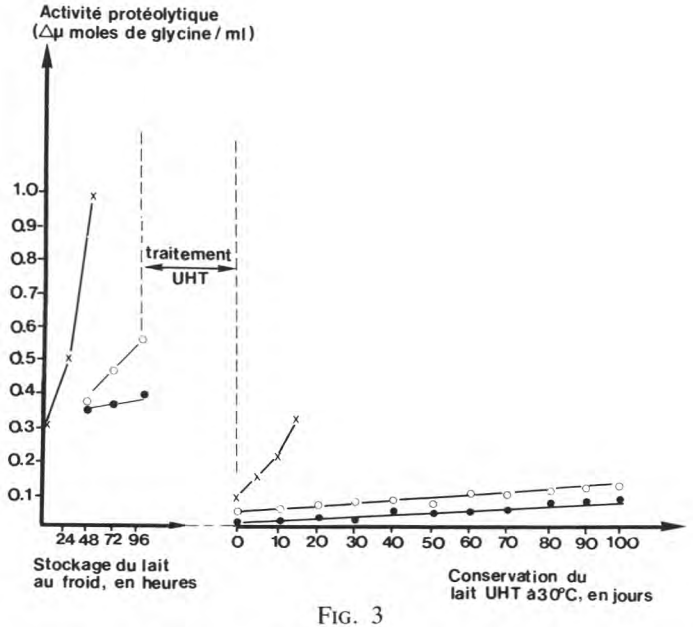



FIG. 3

*Activité protéolytique du lait cru et du lait UHT au cours de sa conservation à 30 °C.*
*Proteolytic activity of raw milk and HTST milk during storage at 30 °C.*

★ *lait ensemencé conservé à 8 °C*
○ *lait conservé à 8 °C*
● *lait conservé à 3 °C*

★ *inoculated milk stored at 8 °C*
○ *milk stored at 8 °C*
● *milk stored at 3 °C*

Les activités protéolytiques obtenues avec le 2e et le 3e essai sont très supérieures à la fourchette de 0,45 Δμ mole glycine/ml citée ci-dessus. Nous vérifions ainsi que la méthode au TNBS permet de détecter un lait dont la flore totale est de $10^6$ cellules/ml et la flore psychrotrophe $8 \cdot 10^5$ cellules/ml. Nos résultats semblent montrer comme ceux de Mc KELLAR *et al.* (1984) que cette méthode est aussi sensible que la méthode HPA (hide power azure) (CLIFFE et LAW, 1982). Ces deux essais sont susceptibles de conduire à des produits laitiers qui auront une mauvaise conservation. Les résultats suivants le montreront. Le 1er essai dont la population finale est très faible ($6 \times 10^4$ cellules/ml) présente une activité protéolytique proche de la moyenne calculée de 0,41 Δμ mole glycine/ml. Cette dernière expérimentation semble montrer qu'un lait de collecte de 48 heures de très bonne qualité bactériologique initiale peut se conserver pendant encore 48 heures dans de bonnes conditions de réfrigération sans conduire au développement microbien trop important et une augmentation significative de son activité protéolytique.

L'état de protéolyse moyen obtenu pour les laits de mélange à l'arrivée à l'usine pour 50 échantillons est de 0,89 ± 0,01 mole glycine/ml à un seuil de confiance de 1 %.

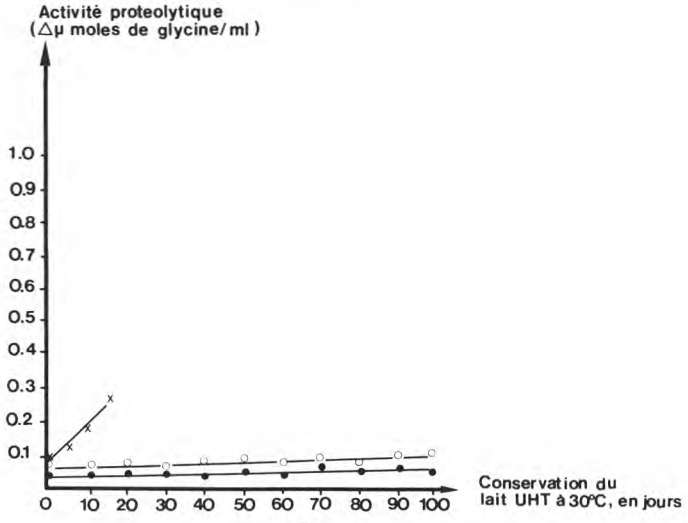



FIG. 4

*Activité protéolytique du lait UHT au cours de sa conservation à 55 °C.*
*Proteolytic activity of raw milk and HTST milk during storage at 55 °C.*

2. *Activité protéolytique des laits après traitement UHT*

Nos résultats (fig. 3) confirment les travaux selon lesquels les protéases sont détruites en partie par un traitement UHT mais qu'il persiste une activité résiduelle évaluée à environ 10 % de l'activité initiale dans notre expérience (RICHARDSON et NEWSTEAD, 1979 ; ADAMS *et al.*, 1975 ; STEPANIAK *et al.*, 1982 ; MOTTAR, 1984).

3. *Activités protéolytiques et état de protéolyse des laits UHT au cours de leur stockage*

L'activité protéolytique des laits UHT stockés à 30 °C et à 55 °C issus de l'essai ensemencé présentent une augmentation très rapide de leur activité protéolytique et de leur état de protéolyse. L'activité atteint 0,15 Δμ mole glycine/ml après 5 jours de stockage à 30 °C et peut conduire à des défauts d'amertume selon Mc KELLAR *et al.* (1984). Pour ce même essai (3$^{e}$ essai), l'état de protéolyse (fig. 5) est de l'ordre de 2 μ mole glycine/ml à cette même période. Le lait UHT conservé à 30 °C sera déstabilisé au 20$^{e}$ jour en atteignant une activité protéolytique de 0,3 Δμ mole glycine/ml au 15$^{e}$ jour. Le même lait UHT conservé à 55 °C a un début de séparation de phase dès le 15$^{e}$ jour. Son activité et son état de protéolyse croissent légèrement moins rapidement qu'à 30 °C. Cependant, dès le 15$^{e}$ jour, ceux-ci dépassent aussi des niveaux acceptables pour le maintien de la qualité organoleptique du produit.

Le 2$^{e}$ essai concernant le lait stocké à 8 °C sans ensemencement a un comportement très différent. Les activités et les états de protéolyse (fig. 3, 4 et 5) croissent très lentement au cours du temps. Après 100 jours de conservation

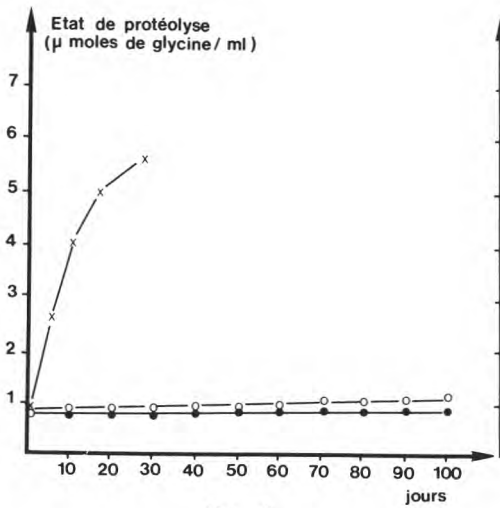



FIG. 5

*Etat de protéolyse du lait UHT au cours de sa conservation à 30 °C.*

*Proteolysis state of HTST milk during storage at 30 °C.*

★ *lait ensemencé conservé à 8 °C*
○ *lait conservé à 8 °C*
● *lait conservé à 3 °C*

★ *inoculated milk stored at 8 °C*
○ *milk stored at 8 °C*
● *milk stored at 3 °C*

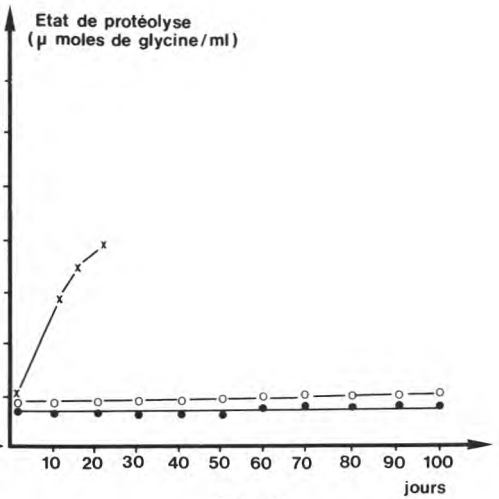



FIG. 6

*Etat de protéolyse du lait UHT au cours de sa conservation à 55 °C.*

*Proteolysis state of HTST milk during storage at 55 °C.*

★ *lait ensemencé conservé à 8 °C*
● *lait conservé à 3 °C*
○ *lait conservé à 8 °C*

★ *inoculated milk stored at 8 °C*
● *milk stored at 3 °C*
○ *milk stored at 8 °C*

à 30 °C et à 55 °C, les activités de protéolyse dépassent légèrement 0,1 Δμ mole glycine/ml et les états de protéolyse 1 μ mole glycine/ml. Ainsi bien que la population initiale soit déjà très importante ($10^6$ cellules/ml pour la flore totale et $8 \cdot 10^5$ cellules/ml pour la flore psychrotrophe) le niveau de protéolyse du lait UHT après 100 jours de stockage reste faible dans le cadre de cette expérience.

Pour le 1er essai, les laits UHT issus du lait très peu contaminé présentent une activité protéolytique et un état de protéolyse respectivement au-dessous de 0,1 Δμ mole glycine/ml et de 1 μ mole glycine/ml après 100 jours de stockage.

### C. *Evolution de la saveur amère des laits UHT au cours de leur stockage*

Le tableau n° 1 montre les résultats obtenus. A 30 °C, la saveur amère est perçue légèrement au seuil de 1 % après 100 jours de stockage pour l'essai où le lait a été conservé à 8 °C sans ensemencement. Cette période de conserva-

TABLEAU 1

*Evolution de l'état d'amertume du lait UHT en fonction du temps de stockage à 30 °C et à 55 °C*

*Bitterness variation of HTST milk with storage time at 30 °C and 55 °C*

| Temps de stockage du lait UHT (jours) | 0 | | 15 | | 40 | | 70 | | 100 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Température de stockage du lait UHT (°C) | 30 | 55 | 30 | 55 | 30 | 55 | 30 | 55 | 30 | 55 |
| *1er essai :* Lait cru réfrigéré à 3 °C | 2,6 NS | 2,6 NS | — | — | 2,7 NS | 6 (**) | 2,7 NS | 6,2 (**) | 2,8 NS | 6,8 (**) |
| *2e essai :* Lait cru réfrigéré à 8 °C | 2,9 NS | 2,9 NS | — | — | 3,2 NS | 6,2 (**) | 3,7 NS | 6,5 (**) | 4 (a) (**) | 9,2 (**) |
| *3e essai :* Lait cru réfrigéré à 8 °C après ensemencement | 3,5 NS | 3,5 NS | — | 4,6 (*) | — | — | — | — | — | — |
| *Témoin* Lait UHT conservé à 4 °C | 2,3 | 2,3 | — | 2,3 | 2,2 | 2,2 | 2,3 | 2,3 | 2,1 | 2,1 |
| *Référence* Leucine (30 mM/l) | 5 | 5 | — | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

(a) : légère amertume.
NS : différence non significative.
* : différence significative au seuil de 2 %.
** : différence significative au seuil de 1 %.

tion dépasse la date limite de vente malgré que la contamination initiale du lait cru ait été très élevée. Pour le lait faiblement contaminé initialement, on ne détecte pas de saveur amère après 100 jours de conservation. Enfin le lait ensemencé n'a pu être dégusté avant sa déstabilisation mais on peut penser qu'il présentait déjà un niveau significatif d'amertume dès le 10e jour de stockage en référence au niveau élevé de l'activité protéolytique à cette période.

A 55 °C, la saveur amère est détectée plus rapidement qu'à 30 °C, mais il semblerait que, pour ces échantillons, ce ne soit pas seulement la saveur amère qui soit perçue par les dégustateurs mais aussi d'autres substances issues en particulier de la réaction de Maillard. En effet à cette température, ce type de réaction se développe rapidement et peut conduire à une flaveur désagréable de type amer dans le lait (MOTTAR *et al.*, 1979). Celle-ci est perçue dès le 40e jour de stockage par les dégustateurs pour les 2 essais issus de lait faiblement ou fortement contaminé.

## III. Discussion

Ces résultats montrent :

1) que la méthode du TNBS permet de trier les laits à l'arrivée à l'usine mais à un niveau de contamination relativement élevé de l'ordre de $8 \cdot 10^5$ psychrotrophes/ml.

2) que les protéases émises par les psychrotrophes sont très thermostables dans le lait puisqu'elles conservent 10 % de leur activité après un cycle complet de traitement UHT (préchauffage, chauffage, chambrage de 4 secondes à 140 °C, refroidissement).

3) que dans notre expérimentation où le lait a subi un traitement UHT indirect, le lait UHT issu des essais non ensemencés présente un niveau de protéolyse faible après 100 jours de stockage. L'amertume commence seulement à être détectée après cette période dans le cas du lait assez fortement contaminé ($8 \cdot 10^5$ psychrotrophes/ml). Cette faible activité protéolytique du lait UHT chauffé indirectement est en accord avec les résultats de MOTTAR *et al.* (1979), CORRADINI et PECHINI (1981), Mc KELLAR *et al.* (1984). Le chauffage indirect permettrait en effet selon ces auteurs un meilleur chauffage du lait et donc une plus grande destruction des protéases. Ce mode de chauffage pourrait être à l'origine d'une plus grande dénaturation de la β lactoglobuline qui, dans cette conformation, inhibe l'activité des protéases (SNOEREN et BOTH, 1981).

4) que, pour l'essai ensemencé, l'activité protéolytique du lait cru est beaucoup plus forte que celle des autres essais malgré une différence de population assez peu importante comparativement à celle du lait conservé à 8 °C non ensemencé. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

a) dans cette expérimentation, on a utilisé deux laits de provenance différente. L'un ensemencé était issu d'une traite d'un producteur, l'autre avait pour origine un lait de mélange de 48 heures. La concentration en plasmine de ces deux laits peut être différente et peut varier de 0,14 à 0,72 mg/l (RICHARDSON et PEARCE, 1981 ; ROLLEMA *et al.*, 1983). Par ailleurs, cette protéase résiste 16 secondes à 140 °C (DRIESSEN, 1983). On peut supposer que cette enzyme soit en quantité supérieure dans le lait ensemencé. Cependant, à un niveau élevé de contamination du lait cru, le rôle imputé à la protéase bactérienne est plus important que celui de la plasmine (MOTTAR, 1984).

b) la deuxième hypothèse rejoint les suggestions de MOTTAR (1984), Mc KELLAR (1981), GILLIS *et al.* (1985) sur l'état physiologique et la nature de la souche. Dans notre expérimentation, en effet, nous avons ensemencé le lait avec la souche 28P12 en fin de phase exponentielle de croissance pour obtenir dans le tank une population égale à environ $10^5$ cellules/ml. L'augmentation très rapide de l'activité dans cet essai comparativement aux deux autres peut donc s'expliquer par l'état physiologique de la souche qui aurait subi une dérépression. La production de protéases se manifesterait alors beaucoup plus rapidement lorsque cette souche est transférée dans le lait après une première culture sur milieu TSB.

5) que pour ce même essai ensemencé, la protéase sécrétée par la souche 28P12 est aussi détruite à un taux de 90 % environ après traitement UHT. Cependant, il persiste un niveau significatif d'activité protéolytique de l'ordre de 0,1 $\Delta\mu$ mole glycine/ml au 1$^{er}$ jour de conservation du lait UHT. Cette activité augmente alors très rapidement pour atteindre dès le 15$^{e}$ jour une valeur supérieure à 0,3 $\Delta\mu$ mole glycine/ml et conduit donc très rapidement à la déstabilisation du lait UHT. Ces résultats peuvent s'expliquer par une renaturation de la protéase de 28P12 phénomène dans lequel les cations divalents auraient un rôle important (PATEL *et al.*, 1986). On peut supposer que la réactivation de l'enzyme 28P12 serait beaucoup plus rapide que celle des enzymes des autres souches présentes dans le lait des deux autres essais. Ces mêmes auteurs ont en effet trouvé que la renaturation des protéases des *Pseudomonas fluorescens* après un refroidissement était plus ou moins importante selon les souches.

En conclusion, il ressort de ces essais l'importance d'un maintien à une température inférieure à 4 °C du lait à l'usine pour limiter au maximum le développement microbien.

En effet, notre expérimentation montre qu'un lait atteignant le niveau de $10^6$ cellules/ml avant traitement UHT peut conduire à son altération dès la fin de la date limite de conservation. Ce risque semble pouvoir être plus élevé car, selon l'état physiologique de la souche, l'activité protéasique peut augmenter plus rapidement dans le lait cru. On peut penser que l'ajout d'un lait très contaminé dans une citerne peut conduire à une rapide augmentation de l'activité protéolytique du lait de mélange. Pour réduire celle-ci, le moyen le plus sûr est de prévenir la contamination et le développement des *Pseudomonas* par une bonne hygiène et un maintien à basse température (0, + 4 °C) du lait. Les travaux de HIMMELBLOOM et HASSAN (1986), Mc KELLAR et CHOLETTE (1986) sur le rôle du calcium, des phosphates et la cystéine permettent de mieux comprendre les mécanismes de la production des protéases. Il est cependant nécessaire de continuer les études à ce sujet ainsi que celles destinées à mieux appréhender la thermostabilité de ces enzymes.

*Reçu le 10 décembre 1986*

*Accepté pour publication le 15 juillet 1987*

## Remerciements

*Nous remercions M$^{mes}$ TORCATIS et NAVARRO, M. ALIX pour leur collaboration technique et M$^{lle}$ BOCQUEL pour le travail de dactylographie.*

*Nous sommes reconnaissants à M. le Professeur LENOIR et à M. GRIPON, Directeur de recherche à l'INRA, pour les conseils qu'ils nous ont adressés pour la rédaction de cet article.*

*Nous remercions aussi M$^{me}$ NICOT de l'ADRIANT de Nantes pour la mise en place de l'analyse sensorielle.*

## Références bibliographiques


ADAMS D.M., BARACH J.T., SPECK M.L., 1975. Heat resistance proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci., 58,* 828-834.

BENGTSSON K., GARDHAGE L., ISAKSON B., 1973. Gelation in UHT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistant proteases. *Milchwissenschaft, 28,* 495-499.

BLOQUEL R., VEILLET-PONCET L., 1980. Evolution et détermination de la flore bactérienne d'un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonction du temps. *Lait, 60,* 474-482.

CLIFFE A.J., LAW B.A., 1982. A new method for the detection of microbial proteolytic enzymes in milk. *J. Dairy Res., 49,* 209-219.

CORRADINI C., PECCHINI G., 1981. Effect on proteinases of different UHT treatments. *Neth. Milk Dairy J., 35,* 393-395.

COUSIN M.A., 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products : a review. *J. Food Prot., 45* (2), 172-207.

DRIESSEN F.M., 1983. Lipases and proteinases in milk. Occurence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milk products. *Neth. Milk Dairy J., 37,* 193-196.

FIELDS R., 1971. The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem. J., 124,* 581-590.

GILLIS W.T., CARTLEDGE M.F., RODRIGUEZ R., SUAREZ E.J., 1985. Effect of raw milk quality on Ultra High Temperature processed milk. *J. Dairy Sci., 68,* 2875-2879.

HIMMELBLOOM B.H., HASSAN H.M., 1986. Effects of cysteine on growth, protease production and catalase activity of *Pseudomonas fluorescens. J. Appl. Environ. Microbiol., 51* (2), 418-421.

LARMOND E., 1977. *Laboratory methods for sensoric evaluation of food.* Res. Branch Canada Dep. Agric. Publi. 1637.

LAW B.A., 1979. Reviews of the progress of dairy science : enzymes of psychrotrophic bacteria and their effect on milk products. *J. Dairy Res., 46,* 573-588.

Mc KELLAR R.C., 1981. Development of off-flavors in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J. Dairy Sci., 64,* 2138-2145.

Mc KELLAR R.C., CHOLETTE H., 1985. Inhibition by chelating agents of the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* 32 A. *J. Dairy Res., 52,* 91-100.

Mc KELLAR R.C., CHOLETTE H., 1986. Possible role of calcium in the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens. J. Appl. Bacteriol., 60,* 37-44.

Mc KELLAR R.C., FROEHLICH D.A., BUTLER G., CHOLETTE H., CAMPBELL C., 1984. The effect of uncooled storage on proteolysis bitterness and apparent viscosity in Ultra High Temperature milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol., 17* (1), 14-17.

MARTH E.H., 1978. *Standard methods for the examination of dairy products.* Am. Publ. Health Assoc. Washington DC.

MIRANDA G., GRIPON J.C., 1986. Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Lait, 66,* 1-18.

MOTTAR J., WAES G., MOERMANS R., NAUDTS M., 1979. Sensoric changes in UHT milk during uncooled storage. *Milchwissenschaft, 34,* 257-262.

MOTTAR J., 1981. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. *Milchwissenschaft, 36,* 87-91.

MOTTAR J., 1984. Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UHT. *Lait, 64,* 29-45.

PATEL T.R., JACKMANN D.M., WILLIAMS G.J., BARTLETT F.M., 1986. Physico-chemical properties of heat stable proteases from psychrotrophic *Pseudomonas. J. Food Prot., 49,* 183-188.

RICHARD J., 1983. Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués. *Lait, 63,* 148-170.

RICHARDSON B.C., PEARCE K.N., 1981. The determination of plasmin in dairy products. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol., 16,* 209-220.

RICHARDSON B.C., NEWSTEAD D.F., 1979. Effect of heat-stable proteases on the storage life of UHT milk. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol., 14,* 273-279.

ROLLEMA H.S., VISSER S., POLL J.K., 1983. Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk. *Milchwissenschaft, 38,* 214-217.

SPADARO A.C.C., DRAGHETTA W., DELLAMA S.N., CAMARGO A.C.M., GREENE L.J., 1979. A convenient manual trinitrobenzene sulfonic acid method for monitoring aminoacids and peptides in chromatographic column effluents. *Anal. Biochem., 96,* 317-321.

SNOEREN T.H.M., BOTH P., 1981. Proteolysis during the storage of UHT sterilized whole milk II. Experiments with milk heated by the indirect system for 4 s at 142 °C. *Neth.. Milk Dairy J., 35,* 113-119.

STEPANIAK L., FOX P.F., DALY C., 1982. Isolation and general characterization of heat stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36. *Biochim. Biophys. Acta., 717,* 376-383.