N° 805

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON
Année scolaire 1928-1929 — N° 165

QUELQUES RECHERCHES sur le LAIT
Action favorisante du *Bacillus Subtilis* dans la fermentation lactique
Le « rattrapage » du lait

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE LYON

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 15 MARS 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Louis LAMBERT

Né le 5 Septembre 1902, à VALLIÈRES (Haute-Savoie)

LYON
Imprimerie BOSC Frères & RIOU
42, Quai Gailleton, 42

1929

QUELQUES RECHERCHES SUR LE LAIT

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année scolaire 1928-1929 — N° 165

QUELQUES RECHERCHES sur le LAIT
Action favorisante du *Bacillus Subtilis* dans la fermentation lactique
Le « rattrapage » du lait

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 15 MARS 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Louis LAMBERT

Né le 5 Septembre 1902, à VALLIÈRES (Haute-Savoie)

LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1929

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur..... M. Ch. PORCHER.
Directeur honoraire. M. F.-X. LESBRE.
Professeur honoraire M. Alfred FAURE, ancien Directeur.

PROFESSEURS

Physique et chimie médicale, Pharmacie, Toxicologie..	MM. PORCHER
Botanique médicale et fourragère, Zoologie médicale, Parasitologie et Maladies parasitaires.....	MAROTEL
Anatomie descriptive des animaux domestiques, Tératologie, Extérieur	TAGAND.
Physiologie, Thérapeutique générale, Matière médicale	JUNG
Histologie et Embryologie, Anatomie pathologique, Inspection des denrées alimentaires et des établissements classés soumis au contrôle vétérinaire...	BALL
Pathologie médicale des Equidés et des Carnassiers, Clinique, Sémiologie et Propédeutique, Jurisprudence vétérinaire	CADEAC
Pathologie chirurgicale des Equidés et des Carnassiers, Clinique, Anatomie chirurgicale, Médecine opératoire	DOUVILLE
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire. Clinique, Médecine opératoire, Obstétrique.....	CUNY
Pathologie générale et Microbiologie, Maladies microbiennes et police sanitaire, Clinique.....	BASSET
Hygiène et Agronomie, Zootechnie et Economie rurale.	LETARD

CHEFS DE TRAVAUX

MM. AUGER. M. TAPERNOUX, Chef de Travaux, agrégé.
LOMBARD.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Président : M. le Dr Albert MOREL, Professeur à la Faculté de Médecine chevalier de la Légion d'honneur.

Assesseurs : M. le Professeur Ch. PORCHER, Directeur à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, Officier de la Légion d'honneur.
M. L. JUNG, Professeur à l'Ecole Vétérinaire.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

A MES PARENTS

A MON ONCLE J.-C. LARAVOIRE
Vétérinaire

A NOS JUGES

A notre Président de Thèse
MONSIEUR LE PROFESSEUR A. MOREL

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CH. PORCHER
Directeur de l'Ecole Vétérinaire

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. JUNG

Avant-Propos

Le vétérinaire n'est pas seulement un médecin, un hygiéniste, il est encore un conseiller technique et, à ce titre, ayant à s'occuper des animaux au point de vue économique, ne peut se désintéresser de leur production et des transformations que l'industrie fait subir à ces dernières. D'autre part, habitant la Haute-Savoie, où la production et l'industrie laitières prennent un essor de plus en plus grand, il est naturel que la question du lait nous ait particulièrement intéressé. Nous aurions voulu montrer combien l'avenir économique de la campagne est lié à la production du lait en Haute-Savoie, faire l'historique de l'industrie laitière dans ce département, mais le manque de temps et la difficulté de la documentation nous ont rendu ce travail impossible et nous ont conduit à faire une thèse d'expérimentation.

Dans l'élaboration de ce travail, nous avons trouvé auprès de M. le Professeur Ch. Porcher, dont la haute compétence en tout ce qui concerne le lait est universellement connue, et des conseils éclairés et une aide précieuse. Il a mis son laboratoire à notre disposition et dirigé nos travaux avec cette bienveillance que tout le monde se plaît à lui reconnaître. Nous ne saurions trop lui exprimer notre vive reconnaissance.

CHAPITRE PREMIER

a) L'action favorisante du *B. Subtilis* dans la fermentation lactique

b) Le " rattrapage " du lait

Les agents microbiens capables de sécréter l'acide lactique au cours de leur développement sont extrêmement nombreux. Orla-Jensen (1) en a fait une classification qui est la plus moderne et la plus rationnelle. Nous renvoyons les lecteurs à ce travail. Nous n'entendons considérer ici comme ferments lactiques que ceux du type *Streptococcus lacticus,* c'est-à-dire les ferments lactiques ordinaires, les plus abondants, les plus constants ; ils présentent déjà de nombreuses variétés.

C. Gorini (2), dans de nombreuses publications, a appelé l'attention sur un fait extrêmement intéressant ;

(1) *Orla-Jensen.* - La classification des bactéries lactiques ; *Le Lait,* 1924, **4**, 468.

(2) *C. Gorini.* - Ma théorie acido-protéolytique sur la maturation des fromages ; *Le Lait,* 1927, **7**, 36.

c'est celui de l'existence de ferments tout à la fois producteurs 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 la seule action de l'acide lactique produit, il puisse se former une précipitation de caséine.

Nous savons que l'acidité facilite beaucoup l'emprésurage, c'est dire, en d'autres termes, que pour une augmentation de l'acidité du lait, tant actuelle que potentielle, il suffit pour obtenir un bon emprésurage de quantités moindres de présure.

Dans le cadre des microbes présurigènes de C. Gorini, nous trouvons donc réuni dans un seul individu microscopique le pouvoir de sécréter à la fois l'acide lactique et la présure. Mais en raison de la grande diversité de la flore du lait, riche en espèces acidogènes, d'une part, en espèces protéolytiques, d'autre part, on est amené à se demander si, dans ces dernières, il n'y aurait pas sécrétion de diastases analogues à la présure dont l'action serait facilitée par l'acide lactique dû aux espèces essentiellement acidogènes.

Il est facile de répondre à cette question, puisque nous savons qu'il existe dans le lait qui n'est jamais recueilli dans des conditions de très grande propreté, des formes bacillaires du type *B. Subtilis*. Or, le *B. Subtilis* est un ferment protéolytique grand sécréteur de protéases, plus voisines du type trypsine que du type pepsine, parce qu'elles agissent plutôt en milieu alcalin qu'en milieu acide.

L'existence simultanée dans le lait du *B. Subtilis* et

de ferments lactiques nous laisse *a priori* supposer que la digestion de la caséine sous l'action des diastases du *B. Subtilis* aboutit à des peptones qui serviront plus facilement d'aliment aux ferments lactiques que la caséine elle-même. Il en résulte que ces derniers seront facilités dans leur développement.

Nous devons à M. S. Marshall (1) une étude extrêmement intéressante sur l'association du *B. Subtilis* et du *streptococcus 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 très voisins 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 tout à l'heure un exemple de ces deux processus. Nous allons voir le *B. Subtilis* favoriser le développement du *streptococcus lacticus*, puis 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 micro-organismes d'espèces variées, des relations entre les divers microbes qu'il contient, du genre de celles que nous étudions maintenant, doivent être observées.

M. S. Marshall a limité son étude à l'association du *B. Subtilis* et du *streptococcus lacticus*. Le streptococcus lacticus avait été isolé d'un « starter » (levain d'une laiterie locale) et le *B. Subtilis* obtenu du Museum

(1) *M. S. Marshall.* - Une étude de l'association du *Streptococcus lacticus* et du *Bacillus subtilis* dans le lait. Journ. of Dairy Science, 1920, **3**, 406. Analysé dans *Le Lait*. 1921, **1**, 41.

américain d'histoire naturelle. Ces deux agents avaient été cultivés dans le lait et on utilisait des cultures âgées de 24 à 48 heures.

Des portions de 100 cm³ de lait stérile étant 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, les titrations étant faites au moyen de la soude en présence de la phtaléine du phénol.

Des recherches de M. S. Marshall, il est évident que la présence du *B. Subtilis* dans le lait stimule la fermentation lactique. L'association des deux microbes étudiés par Marshall développe une plus grande acidité que ne le ferait la culture du seul ferment lactique, et la marche de cette acidité est fonction de la concentration originelle en *B. Subtilis*.

Le tableau ci-contre donne la marche de l'acidité selon que le lait a été ensemencé d'acide lactique pur ou d'un mélange d'acide lactique et de *B. Subtilis*. Dans le premier mélange, on a une goutte de chaque culture; dans le second, il s'agit de 5 gouttes de la culture de *B. Subtilis* contre 1 goutte de la culture de *streptococcus lacticus*.

TABLEAU I

Association du *B. Subtilis* et des ferments lactiques

Temps en heures	Ferments lactiques seuls	Rapport des gouttes 1/1		Rapport des gouttes 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

M. S. Marshall a également mesuré par la méthode des cultures sur plaque les *B. Subtilis* et les ferments lactiques qui pouvaient pousser simultanément dans le lait. Le tableau ci-dessous rassemble les déterminations de l'auteur.

TABLEAU II

Temps en heures	Acidité: Ferments lactiques seuls	Acidité: Association du B. Subtilis et des ferments lactiques, Rapport des gouttes 1/1	Acidité: Association du B. Subtilis et des ferments lactiques, Rapport des gouttes 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

Il est intéresant de constater que le *B. Subtilis* se développe d'abord plus rapidement que le lactique, d'autant plus, bien entendu qu'il en est une plus grande quantité ensemencée. A partir de 24 heures, le déclin de la culture de *B. Subtilis* commence, alors que s'accuse formidablement le développement des lactiques, à un tel point, qu'au bout de 50 heures, il n'y a plus de *B. Subtilis* présent. Il a été arrêté dans son développement, puis tué par les ferments lactiques. Théoriquement, nous fait remarquer M. S. Marshall, il doit exister un optimum des rapports initiaux entre le *B. Subtilis* et le *streptococcus lacticus*.

Voici les conclusions intéressantes du travail de M. S. Marshall:

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'ils exerce vis-à-vis du *streptococcus lacticus*.

3° La proportion optimum de *B. Subtilis* par rapport au *streptococcus lacticus* qu'il faut dans le lait à l'origine pour obtenir la meilleure action stimulante est très petite; elle est approximativement de 22/10.000.

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

Nous avons repris les recherches de M. S. Marshall sur l'association du *B. Subtilis* et du *streptococcus lacticus* en étant guidé 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. C'est ce qu'on appelle « rattraper » le lait, voulant dire par là qu'on cherche à le ramener à son 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 et bicarbonates de ces bases. Le « rattrapage » du lait dans ces conditions n'est réalisable que pour des laits destinés à être consommés en nature. Dans le cas d'une hyperacidité lactique, la neutralisation ou l'abaissement du taux de celle-ci, c'est-à-dire la neutralisation du lait et son retour vers un degré Dornic normal, 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. Inutile de dire que cette opération n'est pas licite, 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.

On ne saurait, en effet, « rattraper » le lait avec des bases alcalines ou leurs carbonates et bicarbonates, parce que, 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. Le « rattrapage » en vue de l'industrie fromagère ne peut se faire qu'avec des bases alcalino-terreuses ou de la magnésie, parce qu'on tend à faire ainsi du lactate de calcium et 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. La préparation du sérum chloruro-calcique en vue de son examen au réfractomètre est basée sur cette réaction : elle consiste tout simplement à additionner au lait une certaine quantité de chlorure de calcium et à porter au B. M. à l'ébullition. La réussite de l'opération ne dépend pas de l'anion du sel calcique, car tout autre sel calcique soluble pourrait 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 soluble qui joue le même rôle que le chlorure de calcium 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 .

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° dans certains cas particuliers.

Un lait « rattrapé », riche en lactate de calcium qui coagulerait à l'ébullition, peut rester homogène, stable, à 40° et en-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. Celle-ci ne sera pas toujours massive, et elle pourra se traduire par des flocons plus ou moins grossiers. Quoiqu'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. Ces protéases ne semblent pas être du type présure, mais se rapprocher plutôt de la trypsine. 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, papaïne, par exemple, peut coaguler le lait comme la présure, pourvu que l'on opère dans des conditions de température et de réaction déterminées.

La présure décompose la caséine comme l'a montré O. Hammarsten, en paracaséine et en protéose soluble. La paracaséine est très sensible aux sels de calcium et précipite plus facilement en leur présence que ne le fait la caséine, si bien que si, pour une raison qui, au fond, nous échappe, les ferments protéolytiques comme le *B. Subtilis* ont pu à un moment donné se développer dans le lait abondamment, ils auront transformé, 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 alors même que l'hyperacidité que l'on a voulu neutraliser n'était pas considérable.

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

CHAPITRE II

Expériences
Action stimulante du *B. Subtilis* sur le *Streptococcus lacticus*

Le *B. Subtilis* a été isolé par nous d'herbes fraîches et le *streptococcus 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 été ensemencés avec :

1° Le *B. Subtilis* seul ;

2° Le *Streptococcus lacticus* seul ;

3° Un mélange de *B. Subtilis* et de *Strep. lact.*

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'agite pas le lait et que celui-ci coagule sous l'action du développement progressif des ferments lactiques, il se fait un gel, c'est-à-dire 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 paracaséinate calcique, mais alors que le gel lactique est rapide, le gel dû au *B. Subtilis* est tardif. Nous ajouterons que si celui-là est ferme, celui-ci, au contraire, l'est moins.

Les ensemencements, soit de lactique seul, soit de *B. Subtilis* seul, soit d'un mélange de *B. Subtilis* et de lactique 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 présurigène du *B. Subtilis*

Experience I. — 3 décembre 1928.

50 $^{c}/^{m}{}_{3}$ de lait stérilisé sont ensemencés avec 2 $^{c}/^{m3}$ de culture de *B. Subtilis* dans le lait. Le lait témoin a l'acidité suivante :

Acidité titrable soude Dornic : 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* $CaCl^2$ dans la proportion de 1 gr. 11 au litre (N/100). Nous employons une solution de $CaCl_2$ 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 $CaCl^2$ 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.* — Degré Dornic : 19, pH = 6,75.

Ce sont les mêmes déterminations qu'hier. C'est la stabilisation que nous avons signalée tout à l'heure.

Addition de $CaCl^2$ 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 paracaséinate 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 : 3 gouttes de présure Fabre diluée et au 1/10 ont été versées dans 10 $^{c}/^{m3}$ de lait. Il y a donc un retard notable à constater dont nous allons peut-être trouver l'explication les jours suivants.

6 *décembre.* — Degré Dornic : 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 $CaCl^2$ à 40° toujours.

Le témoin ne donne rien, mais le lait additionné de chlorure calcique donne une coagulation rapide en gros flocons qui se soudent très vite pour former un caillé

consistant. La formation de paracaséine 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 45 minutes. 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 sommes pas loin de la limite de l'action de la présure (pH = 7,40-7,50).

Nous recommençons une nouvelle série d'expériences sur le lait ensemencé de *B. Subtilis.*

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

1 $^{c}/^{m3}$ de culture de *B. Subtilis* dans le lait est versé dans les 50 $^{c}/^{m3}$ 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 du lait qui avait été ensemencé le 3.

Degrés Dornic : 12, pH = 7,28.

Addition de $CaCl^2$. — 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 gélée 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°.

TROISIEME SERIE D'EXPERIENCES.

Les flacons ont été ensemencés le 6 décembre, ils ont été examinés le 8.

Le témoin a 18° D. et son pH = 6,80.

Le 8 décembre:

Acidité Dornic: 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 $CaCl^2$. — Lait témoin: rien. Lait ensemencé :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 Dornic: 13°, pH = 7,20.

Addition de $CaCl^2$. — Lait ensemencé: floculation en petits grumeaux presque intantanée.

Addition de présure. — Même résultat qu'hier.

10 *décembre:*

Acidité Dornic: 12° 5; pH = 7,33.

Addition de $CaCl^2$. — Floculation rapide en petits grumeaux.

Présure. — Epaississement tardif

11 *décembre,* soit 5 jours après l'ensemencement initial:

Degré Dornic: 12°; pH = 7,43.

Addition de $CaCl^2$. — Floculation rapide.

Présure. — Comme la veille.

12 *décembre:*

On constate dans les flacons conservés à l'étuve 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 Dornic: 10° 5; pH = 7,64.

Bien qu'il n'y ait qu'une coagulation, très molle à la vérité, on ajoute du $CaCl^2$ 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 Dornic trouvé est de 10.

Association du *B. Subtilis* et de ferments lactiques

Connaissant le développement du *B. Subtilis* dans le lait, nous avons procédé maintenant à la culture simultanée du *B. Subtilis* et du *streptococcus lacticus*. Nous n'avons pas procédé comme M. S. Marshall, à l'ensemencement simultané. Nous n'avons ajouté les ferments lactiques qu'après que le *B. Subtilis* s'était développé dans le lait suffisamment.

13 *décembre:*

A 50 c/m³ de lait stérilisé, nous ajoutons 30 *gouttes* de culture de *B. Subtilis* dans le lait de 24 heures, et l'on porte à l'étuve à 37°.

14 *décembre :*

Dans le ballon ensemencé avec du *B. Subtilis* nous ajoutons 30 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 Dornic	*pH*
Lait + *subtilis* + lactiques	20°	6,75
Lait + lactiques seuls	20°	6,75

Comme le lait stérilisé non ensemencé a la même placidité 20° Dornic 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 Dornic	*pH*
Lait + *Subtilis* + lactiques seuls	62°	5,39
Lait + lactiques	28°	5,82
Lait + lactiques	38°	5,82

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

Seconde Experience

28 *Novembre* 1928

A 9 heures, on ensemence :

1° Un ballon contenant 50 c/m³ du lait stérilisé avec 10 *gouttes* d'une culture pure de ferments lactiques dans le lait;

2° Un même ballon contenant 50 c/m³ de lait avec 10 gouttes d'une culture de *B .Subtilis* en bouillon;

3° Un même ballon avec 10 gouttes de chacune des deux cultures.

On porte à l'étuve à 37°.

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

	Degrés Dornic	*pH*
Lactiques seuls	20°	6,75
B. Subtilis seul	20°	6,75
Mélange	20°	6,75

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

	Degrés Dornic	*pH*
Lactiques seuls	22°	6,63
B. Subtilis 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.*

Le lait ensemencé de lactiques seuls ou mélangé de *B. Subtilis* sont coagulés en un gel assez ferme.

	Degrés Dornic	*pH*
Ferments lactiques	57°	4,88
Subtilis	20°	6,75
Mélange	45°	4,90

Il n'y a pas sensiblement de différence entre les ballons ensemencés de lactiques seuls ou d'un mélange des deux espèces microbiennes.

Deuxieme Experience

29 *Novembre*:

Comme nous le disions plus haut, à 50 c/m³ de lait, nous avons ajouté, non plus 10 gouttes de culture, mais 2 c/m³, ce qui fait une dose environ quatre fois plus forte. L'ensemencement a été fait à 9 heures.

Premier examen, 15 heures 5, soit 6 heures 5 après:

	Degrés Dornic	*pH*
Lactiques seuls	57°	4,88
Subtilis seul	20°	6,75
Mélange	42°	5,73

On porte 10 c/m³ 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 coagule pas.

Troisieme Experience

30 *Novembre:*

On a ensemencé à 9 heures 30, avec 2 c/m³ 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 Dornic	*pH*
Ferments lactiques seuls	30°	6,39
Subtilis seul	20°	6,75
Mélange	32°	6,33

On porte à 40°, 10 c/m³ 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'exsudent sont clairs.

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

CHAPITRE III

Le rattrapage des laits acides

Nous allons nous employer à déterminer jusqu'à quel degré Dornic on peut aller pour « rattraper » le lait, c'est-à-dire pour obtenir un lait homogène, sans flocons, et qu'il reste tel lorsqu'on le porte, au maximum, à 40°.

Pour cela, nous comparerons des laits de même origine, mais d'acidités différentes, acidités que l'on aura développées par un apport voulu d'acide, l'acide lactique en l'espèce, puis nous reviendrons à l'acidité première par addition de chaux, et nous déterminerons le point exact où la température de 40°, température maximum qui n'est même pas réclamée par l'emprésurage, ne déterminera pas le moindre trouble visible, lequel se traduirait par des petits flocons dans la liqueur. Nous opérerons également sur des laits dont l'acidité se serait développée spontanément.

PREMIERE EXPERIENCE

Un lait dont l'acidité est de 30° D. est additionné de 0 gr. 04 de chaux pour 1.000, et il est ainsi ramené à 20° D. La charge en lactate de calcium est de 1 gr. 55 Dès la température ordinaire, nous constatons une fine précipitation qui s'exagère à 40°.

Un lait qui par l'acidification naturelle a été porté à 30° D. est additionné de 0 gr. 400 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 nécesaire. On abaisse ainsi son acidité à 21° D.

Le mélange paraît homogène, mais par agitation, on constate qu'il se dépose sur les parois une fine pellicule formée de petites particules coagulées, et ceci à la température ordinaire.

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

Chauffage à 25°. — Le lait originel a 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 est ramené à 20° D ; il 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°. — Lait acide non « rattrapé » : mêmes constatations que pour le lait chauffé à 25°.

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 voyons 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.

EXPERIENCE II

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.

A la température ordinaire, en transvasant le lait avec précaution, on constate sur les parois du premier flacon une très fine floculation.

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 de 24° D et le même lait « rattrapé » par la chaux et n'ayant plus que 19° D, avec la même quantité de présure. Alors que celui-là coagule en 3 minutes, celui-ci coagule seulement en 3 minutes 20 secondes.

Experience III

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 conclurons 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.

A 250 °/m³ de lait, nous ajoutons de l'acide lactique. Le lait est déjà acide de 25° D, et on ajoute 4 °/m³ d'acide lactique à 8 gr. 85 %.

On amène ainsi le lait à 47° D.

Sur une partie de ce lait, on ajoute à nouveau 2 °/m³ 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 26° 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.

Un lait ayant une acidité Dornic 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 $^{c}/^{m3}$ de lait sont ensemencés à 9 heures 30 avec 1 $^{c}/^{m3}$ de culture de ferments lactiques.

A 2 heures, soit 4 heures 1/2, on a :

Degrés Dornic : 28 ; pH = 6,22.

On ajoute la quantité de chaux nécessaire pour obtenir :

Degrés Dornic : 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 avions ajouté la même quantité de sels dans le lait témoin, c'est-à-dire le lait stérilisé non ensemencé 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 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 lait ensemencé au préalable de *B. Subtilis,* puis de ferments lactiques, de même qu'un lait ensemencé 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 de la paracaséine. Les laits ensemencés de *B. Subtilis* précipitent par addition de chlorure de calcium.

3° Le « rattrapage » 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.

Vu : *Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire de Lyon,*
CH. PORCHER.

Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire,
CH. PORCHER.

Vu : *Le Doyen.*
J. LEPINE.

Le Président de la Thèse,
Dr ALBERT MOREL.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 2 Mars 1929.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
GHEUSI.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos 7

Chapitre premier. — A) L'action favorisante du *B. Subtilis* dans la fermentation lactique. B) Le "rattrapage" du lait 9

Chapitre II. — Action stimulante du *B. Subtilis* sur le *streptococcus lacticus* 19

Chapitre III. — Le rattrapage des laits acides.... 31

Conclusions 39

...osc Frères et Riou, 42, Quai Gailleton. - Lyon.