

Proposition de sujet
Concours général biotechnologies 2015
Epreuve écrite
Partie sujet

Rédacteurs : Mr Brégou Christophe, Mme Brun Frédérique , Mr Harvier Rudolph, Mme Rigard Gisèle, Mme Vignon Catherine, Mr Vignon Laurent.

La fabrication du Saint Nectaire

Le Saint Nectaire est un fromage emprésuré, à pâte pressée non cuite, fermentée et salée. Il est exclusivement fabriqué avec du lait de vache (quelques données sur ce liquide biologique sont rappelées dans le **document 1**) produit dans la zone géographique précisément délimitée par le cahier des charges de l'appellation d'origine protégée (AOP) du Saint Nectaire.

Le lait collecté est transformé en Saint Nectaire soit directement à la ferme à partir de lait cru pour les fromages dits « fermiers », soit à la laiterie à partir de lait pasteurisé pour les fromages dits « laitiers ». Le **document 2** présente les principales étapes de fabrication du Saint Nectaire laitier.

Le sujet portera sur différents aspects de la production du Saint Nectaire, de la lactation à l'obtention du fromage affiné.

Toutes les parties du sujet peuvent être traitées indépendamment les unes des autres.

1 La lactation

La lactation est une fonction physiologique des femelles de mammifères qui se traduit par la sécrétion de lait par les glandes mammaires après la parturition (vêlage¹ dans le cas présent).

1.1 **Histologie de la glande mammaire**

Le **document 3** schématise l'organisation de la glande mammaire de la vache ou pis. Les mamelles sont constituées du trayon relié à des citernes contenant le lait. Différents canaux conduisent le lait des alvéoles (acini mammaires) vers les citernes.

Le lait est donc fabriqué au niveau des alvéoles. Le **document 4** détaille l'organisation d'une alvéole.

- 1.1.1. Préciser si la glande mammaire est une glande endocrine ou exocrine. Justifier la réponse.
- 1.1.2. Reporter les numéros du **document 4** sur la copie et nommer les différentes structures correspondantes.
- 1.1.3. Indiquer le rôle du tissu musculaire de la glande mammaire.
- 1.1.4. Le **document 5** schématise la structure d'une cellule alvéolaire de l'acinus mammaire. Reporter les numéros du **document 5** sur la copie et nommer les structures cellulaires correspondantes. Justifier l'abondance de la structure 3.

1.2 **Les contrôles hormonaux de la fonction reproductrice chez la femelle mammifère lors de la lactation**

Pendant la lactation, tout le processus de la reproduction est modifié. Les cycles ovariens sont plus ou moins bloqués selon l'espèce étudiée. Chez la vache, ceux-ci peuvent reprendre entre 7 et 300 jours après la parturition.

Il est intéressant pour un éleveur de prolonger le plus longtemps possible la production de lait et donc d'empêcher la survenue des cycles ovariens.

La kisspeptine et la prolactine sont deux molécules majeures qui relient lactation et contrôles hormonaux cycliques de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien (HHO).

La kisspeptine est un polypeptide de 54 acides aminés sécrété par des neurones hypothalamiques tandis que la prolactine est une hormone protéique de 199 acides aminés sécrétée par l'antéhypophyse. Elle est responsable de la production et du maintien de la sécrétion lactée.

¹Mise bas chez la vache.

Les hormones de l'axe HHO

- 1.2.1. Le **document 6** représente la communication endocrine. Reporter sur la copie les numéros du **document 6** et nommer les différentes structures.
- 1.2.2. A partir de ce schéma définir une hormone.
- 1.2.3. Grâce aux données et schémas du **document 7**, expliquer le fonctionnement des contrôles hormonaux entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les ovaires (100 mots maximum).
Rappel: l'ovulation est déclenchée par un pic de sécrétion de LH.

Action de la kisspeptine

De récentes études montrent que le fonctionnement d'autres neurones hypothalamiques sécrétant un polypeptide de 54 acides aminés, la kisspeptine, remettrait en cause certains de ces contrôles.

- 1.2.4. Formuler une hypothèse quant au rôle des neurones à kisspeptine au sein de l'axe HHO à l'aide des **documents 8a et 8b**.
- 1.2.5. Reproduire et compléter le schéma du **document 7b** afin d'y intégrer l'action de la kisspeptine.

L'axe HHO et la lactation

Le **document 9** rassemble des résultats expérimentaux obtenus chez la souris et montrant la relation entre la prolactine et la kisspeptine.

- 1.2.6. Justifier l'emploi du tampon PBS comme solution de contrôle.
- 1.2.7. Dédire du **document 9** l'effet de la prolactine sur le fonctionnement de l'axe HHO. Préciser la cible de la prolactine.

2 Effet de l'alimentation des vaches sur la composition du lait

L'alimentation des vaches influe sur le volume de lait produit ainsi que sa composition, notamment en protéines et en lipides.

Ces composants sont importants pour plusieurs raisons :

- ils sont pris en compte pour le paiement du lait à l'éleveur ;
- les protéines sont les principales responsables de la fermeté du fromage tandis que les lipides participent au moelleux et aux qualités aromatiques ;
- la réglementation de l'étiquetage des produits alimentaires évolue vers plus de précision en ce qui concerne les lipides. Depuis décembre 2014 les fabricants devront mentionner la teneur de l'aliment en acides gras saturés (AGS). En effet il a été montré que ces acides gras saturés favorisent l'apparition de maladies cardiovasculaires, s'ils sont consommés en excès. Par contre les acides gras poly-insaturés (AGPI) exerceraient une action protectrice vis-à-vis de ces mêmes maladies.

2.1 Variation de la ration alimentaire des vaches sur l'année

Document 10 : extraits du cahier des charges de l'AOC-Fromage « Saint-Nectaire ».

Document 11 : part de pâturage dans la ration des vaches en fonction de la période

- 2.1.1 Vérifier si la durée réglementaire de pâture est respectée sur le **document 11**.
- 2.1.2 Indiquer la composition de la ration alimentaire des vaches en juillet et août.
- 2.1.3 D'après le **document 10**, donner une composition possible de la ration alimentaire en hiver, en respectant le cahier des charges imposé.

2.2 Influence de l'apport énergétique de la ration des vaches sur la production de lait

Une expérience hors cahier des charges du « Saint-Nectaire ». a été conduite sur des vaches de même race, dont le vêlage a été synchronisé. On a fait varier leur alimentation au cours d'une période de lactation complète (10 mois après le vêlage). Les vêlages ayant eu lieu en

hiver, les vaches ont été d'abord nourries avec deux types de rations alimentaires « conservés » :

- une ration alimentaire à densité énergétique haute (H) : 65 % d'ensilage de maïs, 5 % de foin et 30 % d'aliments concentrés,
- une ration alimentaire à densité énergétique basse (B) : 45 % d'ensilage d'herbe, 40 % de foin, 15 % de concentrés.

Au bout de 127 jours, les vaches ont été placées en pâturage. Certaines vaches recevaient un complément de 4 kg d'aliments concentrés (ration énergétique haute H') tandis que d'autres ne consommaient que l'herbe des prairies (ration énergétique basse B').

Les vaches ont été divisées en 4 lots selon les types d'alimentation reçue : un lot H-H', un lot H-B', un lot B-B', un lot B-H'.

La production individuelle de lait a été mesurée pendant toute l'expérience. Les résultats figurent sur le **document 12**.

2.2.1 Commenter l'évolution de la production de lait au cours de la période de lactation, pour les vaches du groupe H-H'.

2.2.2 A partir de l'analyse du **document 12**, conclure quant à l'effet de l'apport énergétique sur la production de lait. Justifier la complémentarité de la ration alimentaire en été.

2.3 Influence de la nature des aliments consommés sur la composition en matières grasses et azotées du lait

A apports énergétiques égaux, la nature des aliments ingérés peut avoir un effet sur la composition du lait.

Le tableau du **document 13** montre l'influence de deux régimes alimentaires sur la composition du lait.

Analyser les résultats du tableau et en déduire si la nature des aliments consommés par les vaches en hiver et en été a une importance significative sur les constituants étudiés.

2.4 Influence de l'alimentation sur la composition en acides gras de la matière grasse du lait

Une étude a été menée en Auvergne pour montrer l'influence d'une alimentation de type pâturage ou de type foin sur la nature des acides gras du lait. Les lipides du lait sont composés essentiellement de triglycérides (esters de glycérol et d'acides gras).

Les acides gras

Le **document 14** montre la formule développée de l'acide palmitique, qui représente 25 à 30 % des acides gras du lait et d'un isomère de l'acide linoléique, présent en quantité variable dans le lait.

2.4.1 Justifier le terme « acide » présent dans la dénomination « acide gras ».

2.4.2 L'isomère de l'acide linoléique est « polyinsaturé ». Préciser le nombre de doubles liaisons entre carbones, leur position et leur configuration (Z ou E).

Variation de la composition en acides gras des triglycérides du lait

Un lot de douze vaches est placé en pâturage sur une prairie à 1000 mètres d'altitude, comportant une diversité floristique importante (DIV). Un autre lot de douze vaches est nourri au foin et maintenu en stabulation². Des prélèvements de laits de chacun des deux lots ont été réalisés en début (P1, juin), milieu (P2, juillet) et fin de période de pâturage (P3, août). Les échantillons ont permis l'analyse des acides gras.

Les résultats figurent dans le **document 15**.

2.4.3 Comparer la composition des laits issus de vaches nourries au pâturage et celle des vaches nourries au foin.

2.4.4 Proposer une interprétation de la variabilité de la composition en acides gras des laits des vaches qui pâturent.

² Stabulation : bétail parqué dans un espace restreint et clos.

2.5 Synthèse

En tenant compte de l'ensemble des résultats et interprétations, récapituler les principales différences entre lait d'été et lait d'hiver : volume produit et composition en lipides et protéines.

3 Contrôles et traitements préliminaires du lait à la laiterie

Arrivé à la laiterie, le lait subit un contrôle qualité rapide : mesure de la température, du pH et recherche d'inhibiteurs. Si les résultats sont conformes, le lait est transféré dans une cuve de stockage réfrigérée en attendant d'être utilisé.

3.1 Contrôle de la température et du pH

Le lait issu de la traite des vaches allaitantes n'est pas stérile, il contient des bactéries commensales du trayon (bactéries lactiques essentiellement) et des micro-organismes provenant de l'environnement (animaux, étable, personnel, matériel...). Dès sa récolte, le lait est refroidi à 4°C dans une cuve réfrigérée puis transporté à la laiterie, au plus tard 48h après sa récolte.

3.1.1 Citer une conséquence d'un réchauffement du lait au cours du transport.

3.1.2 Le pH naturel du lait frais est compris entre 6,4 et 6,8. Cette valeur diminue au cours du stockage et ce d'autant plus vite que la température augmente. Proposer une explication à ce phénomène.

3.2 Recherche d'inhibiteurs

Une recherche d'inhibiteurs microbiens est systématiquement effectuée pour vérifier que le lait a les aptitudes fromagères attendues. Si le lait contient des antibiotiques (suite aux traitements d'animaux malades, en particulier les mammites) il ne pourra pas être transformé en fromage.

Les antibiotiques les plus souvent utilisés en usage vétérinaire possèdent dans leur structure un cycle bêta-lactame (voir **document 16**). Les antibiotiques à cycle β -lactame inhibent l'activité d'une carboxypeptidase nécessaire à la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Sans peptidoglycane, les bactéries meurent par choc osmotique. Les bactéries lactiques sont très sensibles à ce type d'antibiotiques.

Pour mettre en évidence la présence de ces antibiotiques dans le lait, la laiterie utilise la méthode Penzym basée sur la propriété du cycle β -lactame d'inhiber spécifiquement et quantitativement l'activité d'une DD-carboxypeptidase qui hydrolyse les substrats synthétiques de type « résidu peptidique-DAla-DAla » avec libération de D-Alanine.

L'activité de la DD-carboxypeptidase est mesurée grâce à deux réactions secondaires :

- la D-Alanine libérée est transformée par une oxydase stéréospécifique en acide pyruvique avec libération de peroxyde d'hydrogène ;
- le peroxyde d'hydrogène produit, oxyde sous l'action d'une peroxydase, un colorant organique jaune en un produit oxydé rose.

3.2.1 Présenter sous forme schématique le principe de la méthode de recherche d'antibiotiques dans le lait par la méthode Penzym.

3.2.2 Des témoins positif et négatif sont réalisés en parallèle. En utilisant le **document 17**, préciser la composition et l'aspect attendu pour chaque témoin après incubation.

3.2.3 A l'aide des **documents 16a et 16b**, préciser quelles seront les familles d'antibiotiques détectées par le test Penzym, justifier.

Au moment de la production, le lait est déstocké, chauffé à 60°C pour être écrémé dans une écrémeuse (centrifugeuse industrielle permettant de séparer la crème du lait écrémé en continue). La crème et le lait écrémé sont ensuite pasteurisés séparément puis re-mélangés de façon à standardiser le lait à 32 g.L⁻¹ de matière grasse.

3.3 Ecrémage

- 3.3.1 Donner le principe de séparation de 2 liquides de densités différentes dans une centrifugeuse. En prenant l'exemple du lait, préciser quel est le constituant de la phase la plus dense et celle de la phase la moins dense.

Selon la loi de Stokes, la vitesse de séparation (v_s) des 2 phases dépend de :

- D, diamètre des particules contenues dans le produit ;
- ρ_1 et ρ_2 , masses volumiques des 2 liquides à séparer ;
- g , accélération de la pesanteur ;
- η , viscosité du produit à séparer.

Equation aux grandeurs de la loi de Stokes :

$$v_s = \frac{D^2 \cdot (\rho_1 - \rho_2) \cdot g}{18 \cdot \eta}$$

- 3.3.2 A l'aide du **document 18**, relever l'effet de la chaleur sur la viscosité du lait.
- 3.3.3 Expliquer l'intérêt du chauffage du lait avant l'écémage en s'appuyant sur l'équation aux grandeurs.

3.4 Pasteurisation

La pasteurisation en industrie laitière consiste à faire passer le produit dans un pasteurisateur constitué d'un échangeur à plaques dans lequel le lait est chauffé à une température donnée pendant un temps précis, puis refroidi immédiatement.

Barème de pasteurisation :

| Produits | Température | Durée |
|----------|-------------|-------|
| Lait | 72°C | 20s |
| Crème | 73°C | 60s |

La valeur pasteurisatrice (V_p) se calcule en comparant le traitement thermique effectué réellement à la température T à un traitement théorique, de même efficacité, mais à une température de référence ($T_{réf}$).

Plus la V_p est élevée, plus le traitement thermique est efficace.

La valeur pasteurisatrice se calcule selon l'équation aux grandeurs :

$$V_p = 10^{\left(\frac{T - T_{réf}}{z}\right)} \cdot \Delta t$$

Avec T = la température du barème ;

$T_{réf} = 60^\circ\text{C}$;

$z = 7^\circ\text{C}$ (valeur de référence pour le traitement du lait)

Δt = la durée du barème.

Pour le calcul, on admettra que la température de traitement est atteinte immédiatement.

- 3.4.1 Après lecture du **document 19**, préciser l'intérêt de la pasteurisation.
- 3.4.2 Ecrire l'équation aux unités pour l'équation aux grandeurs du calcul de V_p .
- 3.4.3 Ecrire l'équation aux valeurs numériques pour le calcul des valeurs pasteurisatrices, V_p , pour le lait et pour la crème.
Exprimer ces résultats de façon correcte avec une incertitude élargie, $U = 25$ s.
- 3.4.4 Comparer les résultats obtenus en 3.4.3. A l'aide du **document 19** expliquer pourquoi la crème et le lait ne subissent pas le même traitement thermique.

4 Emprésurage du lait et obtention du caillé

La chymosine, enzyme utilisée dans l'industrie fromagère pour coaguler le lait, est traditionnellement extraite à partir du quatrième estomac de veaux non sevrés, la caillette. La préparation ainsi obtenue est dénommée **présure**.

La présure est composée principalement de deux protéases (enzymes) en mélange : la **chymosine** 80% et la **pepsine** 20%.

La France, pays de fromages, reste l'un des seuls pays au monde à utiliser encore majoritairement ce type de préparation coagulante.

Seuls les fromages d'Appellation d'Origine Protégée (AOP), sous labels fermiers ou Bio, de par leur cahier des charges respectifs, doivent obligatoirement utiliser de la présure. C'est le cas du « Saint-Nectaire ».

4.1 La chymosine est la principale enzyme coagulante de la présure

La chymosine (EC.3.4.23.4) est l'enzyme coagulante majeure de la présure (80%).

4.1.1 Une enzyme est un biocatalyseur. Définir ce terme.

4.1.2 A quelle classe d'enzyme appartient la chymosine. Justifier la réponse.

Les **documents 20 et 21** donnent les représentations des structures primaire et tertiaire de la chymosine.

4.1.3 A l'aide du **document 20**, proposer une définition de la structure primaire d'une protéine.

4.1.4 Rappeler le nom de la liaison qui intervient dans l'établissement de la structure primaire d'une protéine.

La chymosine est sécrétée par la caillette du veau sous forme d'un proenzyme inactif constitué successivement des séquences du propeptide et de la chymosine (cf. **document 20**).

4.1.5 A l'aide du **document 22a**, préciser le nom des acides aminés N-terminal et C-terminal du proenzyme.

4.1.6 Le **document 21** représente la structure tertiaire de la chymosine. Citer les différents types de structures secondaires visibles sur le **document 21**. Nommer la liaison qui stabilise ces structures secondaires.

4.1.7 Trois ponts disulfures entre les acides aminés 105 et 110 ; 265 et 269, 308 et 341 stabilisent la structure tertiaire. Quelle est la nature de cette liaison? A l'aide du **document 22b** représenter la structure d'un pont disulfure entre deux cystéines.

4.1.8 Le site actif de la chymosine comprend 2 acides aminés numéros 92 et 274. Identifier ces deux acides aminés. Préciser les rôles des acides aminés constituant le site actif.

4.2 Les caséines du lait, substrat de la chymosine

Les caséines sont des molécules originales qui forment plus de 75% des protéines totales du lait de vache. Les caséines se trouvent à l'état naturel sous forme de structures fortement associées : les micelles de caséines. Elles sont phosphorylées (phosphoprotéines) et présentent comme caractéristique essentielle de précipiter à pH = 4,6, à température ambiante et de ne pas être dénaturées par un chauffage à 100°C car elles présentent des structures polydispersées (cf. **document 23**) et des masses moléculaires faibles.

Les caséines se composent de 4 protéines majeures, les caséines alpha S1, alpha S2, bêta et kappa.

4.2.1 Après lecture et analyse du **document 23**, nommer les structures 1, 2, 3 du schéma de la sous-micelle de caséine.

4.2.2 Les caséines du lait ne sont pas dénaturées par chauffage à 100°C. Rappeler en quoi consiste la dénaturation des protéines.

4.3 Action de la chymosine sur la caséine kappa

La chymosine est une endopeptidase qui hydrolyse la liaison peptidique entre la phénylalanine (F) en position 105 et la méthionine (M) en position 106 de la caséine kappa du lait.

La chymosine va déstructurer la micelle de caséine et produire la coagulation des caséines du lait. On peut distinguer trois phases dans la coagulation (cf. **document 24**) :

- l'hydrolyse enzymatique de la caséine kappa ;
- l'agrégation des micelles de caséines déstabilisées (paracaséines) ;
- la réticulation qui aboutit à la formation d'un gel et à la séparation du caillé et du lactosérum.

Lors de l'hydrolyse enzymatique de la caséine kappa, la chymosine hydrolyse spécifiquement la caséine kappa au niveau de la liaison peptidique entre PHE₁₀₅ et MET₁₀₆. Cette hydrolyse se traduit par la libération d'un peptide, le caséinoglycomacropeptide (CMP) (partie C-terminale) soluble et de paracaséine insoluble (partie N-terminale). La libération du CMP déstabilise la micelle de caséine.

4.3.1 A l'aide du **document 25** qui représente la structure primaire de la caséine kappa, indiquer sur votre copie la taille (nombre d'acides aminés) du CMP et de la paracaséine.

4.3.2 A l'aide du **document 22**, écrire la formule développée du dipeptide PHE-MET et repérer la liaison hydrolysée par la chymosine.

L'hydrolyse enzymatique de la liaison PHE₁₀₅-MET₁₀₆ de la caséine kappa est très rapide. La vitesse d'hydrolyse est assimilée à une cinétique de type Michaelis-Menten. Le **document 26** rend compte des résultats d'une étude expérimentale réalisée en tampon citrate pH = 6,2, à 30 °C, pour différentes concentrations initiales en caséine kappa (= substrat) et de leur exploitation graphique selon la représentation de Lineweaver et Burk.

4.3.3 Déterminer les constantes cinétiques K_m en mmol.L^{-1} et V_{max} en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ de la chymosine. Justifier la réponse.

Les valeurs de K_m et V_{max} seront exprimées avec 2 chiffres significatifs.

4.4 Purification de la chymosine à partir de la présure

La présure issue de la caillette du veau est composée de 80% de chymosine et de 20% de pepsine.

La qualité d'une présure étant essentiellement dépendante de sa teneur en chymosine, il est nécessaire de séparer la chymosine de la pepsine pour préparer ensuite une présure composée de 95% de chymosine et de 5% de pepsine. Pour effectuer cette séparation, on peut réaliser une chromatographie d'échange d'ions. Le milieu est amené à pH = 5,30 ± 0,05 puis traité sur une résine échangeuse d'ions dont les caractéristiques sont indiquées dans le **document 27a**.

Les **documents 27b et 27c** rappellent le principe général de la chromatographie échangeuse d'ions et les courbes de charges de la chymosine et de la pepsine en fonction du pH du milieu.

4.4.1. Du **document 27** déduire le type de résine échangeuse d'ions utilisée pour séparer la chymosine et la pepsine.

4.4.2. A l'aide des courbes de charges relatives de la chymosine et de la pepsine, déduire l'enzyme retenue par la résine échangeuse d'ions à pH = 5,30 et celle qui sera éluée. Justifier la réponse.

4.4.3. A l'aide des caractéristiques de la résine échangeuse d'ions utilisée, proposer un protocole pour éluer l'enzyme retenue à pH = 5,30. Justifier la réponse.

4.5 Protéolyse et amertume

Le « Saint-Nectaire » est, comme beaucoup d'autres fromages, caractérisé par une certaine amertume. Si cette note légèrement amère est une composante normale de ce fromage, un excès est considéré comme un défaut, donc indésirable. La qualité du lait, l'emprésurage, la nature des ferments jouent un rôle déterminant dans le développement de ce goût.

L'amertume est principalement due à la production de peptides et d'acides aminés issus de la protéolyse des protéines du lait. Les enzymes et leurs caractéristiques intervenant dans ce processus sont les suivantes :

| Origine | Type | Exemple | pH optimum | Remarque |
|--|----------------|------------------------|------------|-----------------|
| Enzyme de la coagulation par la présure | Endopeptidases | Chymosine Pepsine | <5 | Thermo-instable |
| Protéases propres au lait | Endopeptidases | Plasmine Cathepsine | 7,5 <5 | Thermo-stable |
| Protéases des bactéries lactiques : - liées à la paroi cellulaire - Intracellulaires | Endopeptidases | Lactocépine | 5,5-6,5 | |
| | Exopeptidases | Amino-peptidases | 6,5-8 | |

On distingue la protéolyse primaire qui résulte de l'action des protéases sur les caséines du lait et la protéolyse secondaire qui résulte de l'action des protéases sur les peptides issus de la protéolyse primaire. La protéolyse secondaire aboutit à la formation d'oligopeptides et d'acides aminés.

Effet de la température de brassage³ et d'emprésurage sur la protéolyse

L'isoélectrophorèse présentée sur le **document 28** donne les résultats pour 2 températures de brassage et d'emprésurage d'un fromage.

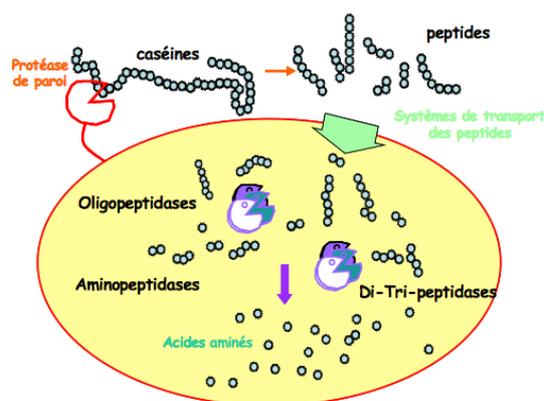
4.5.1 Analyser cet électrophorégramme et l'effet de la température du brassage et de l'emprésurage sur la protéolyse.

4.5.2 En déduire la température minimisant la protéolyse.

Effet des bactéries lactiques

Streptococcus thermophilus est un des ferments utilisés dans la fabrication du « Saint-Nectaire ». Il possède une protéase de paroi lui permettant d'hydrolyser les caséines, puis les produits d'hydrolyse sont eux-mêmes pris en charge par des peptidases intracellulaires. Ces bactéries sont ainsi capables d'utiliser l'azote du lait sous forme soluble (peptides et acides aminés) et insolubles (caséines).

L'ensemble formant un système protéolytique complet.



Système protéolytique des *Streptococcus thermophilus*.

A l'intérieur de cette espèce, certaines souches sont dépourvues de protéase de paroi. Lorsque l'on étudie la croissance comparée de souches avec et sans protéase de paroi, un phénomène singulier est constaté, il est présenté dans le **document 29**.

4.5.3 Analyser les courbes de croissance du **document 29**.

4.5.4 Expliquer le phénomène biphasique constaté avec les bactéries protéase +.

4.5.5 Justifier l'utilisation de souches protéase - pour limiter la production d'amertume.

³Etape précédant l'emprésurage, qui consiste à mélanger les ferments lactiques au lait.

5 Dernière étape : l'affinage

Après essayage, les fromages « blancs » sont lavés puis mis en cave pour subir un affinage d'une durée minimum de 4 semaines, période pendant laquelle chaque fromage est frotté et retourné une fois par semaine pour éviter sa déformation.

L'affinage permet au fromage d'acquiescer toutes ses qualités organoleptiques⁴ grâce essentiellement à la transformation des matières organiques du lait par la flore microbienne. La flore est apportée par le lait cru dans les fromages fermiers ou ajoutée (ferments lactiques sélectionnés) après pasteurisation pour les fromages laitiers. A ces flores s'ajoutent, à la surface des fromages, les micro-organismes de l'environnement des caves.

Pendant l'affinage on observe des modifications de la texture, de la couleur, du goût et de l'odeur d'autant plus complexes que la flore microbienne est elle-même complexe.

Pendant l'affinage, le développement de bactéries pathogènes est redouté, particulièrement celui de *Listeria monocytogenes* pouvant entraîner de graves intoxications alimentaires chez les personnes fragiles (jeunes enfants, femmes enceintes, personnes âgées et immunodéprimées).

Pour mieux comprendre les facteurs et conditions pouvant inhiber le développement de *Listeria monocytogenes* des études ont été réalisées par les équipes INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) sur du fromage à pâte pressée comme le « Saint-Nectaire ».

5.1 Effet de la présence d'un consortium bactérien issu du lait cru sur la croissance de *Listeria monocytogenes* au cœur et en surface du fromage.

La composition du consortium bactérien «*anti-listerial*» sélectionné à partir de lait cru est présentée dans le tableau 1 du **document 30**.

Les résultats de l'effet de la présence du consortium par rapport à un témoin (control) sur la croissance de *Listeria monocytogenes* sont présentés dans le **document 31**.

- 5.1.1. Analyser le **document 31** et déduire l'effet du consortium «*anti-listerial*» sur le développement de *Listeria monocytogenes* dans et sur le fromage pendant l'affinage.
- 5.1.2. D'après les conclusions précédentes, préciser quel type de fabrication, laitière ou fermière, permettrait naturellement un effet inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*. Justifier votre réponse.
- 5.1.3. Proposer un mécanisme expliquant l'effet du consortium bactérien.

5.2 Effet des conditions d'affinage (température et humidité relative) sur la croissance de *Listeria monocytogenes* pendant l'affinage

Des fromages ensemencés avec le consortium «*anti-listerial*» et des fromages témoins sont affinés dans des conditions de température et d'humidité relative (%RH) différentes. La concentration en *Listeria monocytogenes* (exprimée en UFC/g de fromage) est analysée au cœur et en surface du fromage au cours de l'affinage. Les résultats sont présentés sur le **document 32**.

- 5.2.1. Identifier l'effet de l'augmentation de l'humidité relative sur la croissance de *Listeria monocytogenes* au cœur (core) du fromage au bout de 28 jours d'affinage.
- 5.2.2. A partir de l'ensemble des résultats précédents proposer les conditions optimales d'affinage permettant de limiter le développement de *Listeria monocytogenes*.

⁴Qui agit sur la perception sensorielle, pour les aliments : goût, odeur, couleur, aspect, consistance.