

COMMUNICATIONS

Le contrôle sanitaire du lait

IV. — Inspection du lait stérilisé

par G. THIEULIN, D. BASILLE et R. ROSSET

Différent du lait concentré stérilisé, véritable conserve, est apparu sur le marché français, depuis environ 4 ans, un lait de consommation directe, étiqueté « lait stérilisé », conditionné en flacons de verre capsulés.

Ce lait stérilisé est présenté sous forme de lait entier (à 30 ou 34 grammes de matière grasse par litre), demi-écrémé (17 grammes au moins) ou écrémé et, au surplus, aromatisé ou non.

Légalement, le problème est simple : le décret du 25 mars 1924 portant règlement d'administration publique de la loi du 1^{er} août 1905 sur la répression des fraudes, en ce qui concerne le lait et les produits laitiers, puis le décret du 16 juillet 1955 concernant le lait et les boissons à base de lait, ont évidemment prescrit que « tout lait vendu sous la dénomination de lait stérilisé ne doit contenir aucun germe vivant ». La difficulté consiste à vérifier que le produit désigné est réellement stérile.

La stérilisation du lait est délicate, car un chauffage rigoureux réalisé à cette fin risque fort de modifier les caractères organoleptiques, sans vouloir parler ici de l'éventuelle altération des valeurs biologiques initiales, et l'opération constituée, ne serait-ce que par ses conséquences commerciales, une arme à deux tranchants. Cependant, des modalités nouvelles, actuellement expérimentées, sont susceptibles de permettre, dans un proche avenir semble-t-il, d'atteindre le but.

Il nous faut dire, en effet, que le conditionnement du lait stérilisé exige, pour être rationnel, un emballage *perdu* (grande difficulté de nettoyage, pour réemploi, des bouteilles à goulot étroit), *étanche* (toute fuite impossible), *opaque* (action de la lumière évitée) et *résistant* (permettant une agitation violente pendant le chauffage et le refroidissement consécutif).

C'est pourquoi, à la suite d'un examen, jugé satisfaisant, d'un lait stérilisé conditionné en flacons de verre capsulés, il n'est pas possible de préjuger de sa durée de conservation ni même, plus simplement, du maintien de ses caractères organoleptiques.

Ces réserves étant faites, le contrôle de la stérilité, en son sens absolu, exigerait des épreuves sans nombre et sans fin. Ayant retenu par exemple un mode opératoire apparemment sévère, il serait toujours permis de penser qu'une épreuve complémentaire, ou prolongée davantage, serait à même de révéler des éléments qui ont été très fortement atténués par l'action thermique mise en œuvre.

D'autre part, une telle pratique, tendant à des vérifications d'une rigueur extrême, pourrait être considérée comme réalisant des artifices par trop éloignés des conditions qui sont celles que les laits de cette catégorie rencontrent normalement au cours du stockage et de la distribution.

On pourrait alors accuser l'opérateur, non pas de réveiller des spores dormantes, mais, en quelque sorte, de susciter le développement de spores qui étaient virtuellement mortes, puisqu'elles n'avaient aucune chance pratique de germer.

Inversement, à des sollicitations timides, il peut être reproché de laisser vendre des laits insuffisamment éprouvés, dans lesquels des germes, non décelés par une inspection trop libérale, risqueraient de se développer avant que les laits en question aient pu être consommés.

En tout état de cause, il importe que la santé publique soit protégée, et qu'à défaut de garantie formelle, la sécurité offerte soit la plus grande possible.

Où donc est la juste mesure ?

De toute évidence, il nous faut satisfaire à deux exigences :

1° Le contrôle envisagé doit inclure dans ses conclusions une marge de sécurité et, pour cela, se montrer plus sévère que ne le sont les conditions normalement réalisées de l'usine au consommateur ;

2° Ce contrôle est nécessairement exécuté dans des délais beaucoup plus courts que ne peuvent l'être, réunis, le stockage et la distribution des produits considérés.

En vue de rester fidèles à ce double objectif, nous avons expérimenté des techniques devant nécessairement, sous peine d'être pratiquement sans objet, s'inscrire dans les possibilités matérielles journalières d'un service d'inspection des denrées d'origine animale.

Dans ces conditions, et à la suite de tâtonnements préliminaires, nous avons réalisé l'expérimentation suivante sur 378 prélèvements de lait mis en vente sous la dénomination « lait stérilisé ».

Chaque prélèvement a comporté trois échantillons sous forme de trois flacons, provenant d'un même lot.

PREMIER ÉCHANTILLON.

Cet échantillon est soumis à l'épreuve dite de turbidité, telle que préconisée par ASHAFFENBURG (1).

Cette épreuve représente le seul critère réglementaire adopté en Grande-Bretagne pour le contrôle officiel des laits stérilisés et résulte de la prescription même, relative à leur préparation : « Le lait sera élevé et maintenu à une température non inférieure à 212° F (100° C) pendant une durée suffisante pour satisfaire au test de turbidité » (2). Ce test tend à vérifier que le degré de chauffage (température \times temps d'exposition) auquel a été soumis le lait n'a pas été inférieur au minimum reconnu exigible pour la stérilisation.

L'épreuve met en évidence la dénaturation des protéines solubles sous l'action de la chaleur. La courbe de dénaturation des protéines solubles n'est pas précisée. Au cours d'expériences sur le contrôle du chauffage de biberons de lait, nous avons vérifié que le seuil de turbidité négative était obtenu

(1) Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service G.B. (1947, p. 159).

(2) Statutory Instruments — 1949, n° 1.589 — Food and Drugs, England, The Milk (Spécial Désignation) (Pasteurised and Sterilised Milk) Regulations. 25 th August 1949. HMSO-York House, Kingsway, London, W.C. 2.

par une ébullition à feu nu poursuivie pendant cinq minutes, ou par un séjour de 15 minutes au bain-marie bouillant (1).

L'échantillon de lait à examiner est amené à la température du laboratoire et l'on opère comme suit :

Placer, dans un ehrlenmeyer de 50 cc., 20 ml. de lait et 5 gr. de sulfate d'ammonium. Agiter pendant une minute, laisser reposer pendant au moins 5 minutes, filtrer sur filtre plissé Whatman n° 12. Recueillir au moins 5 ml. de filtrat dans un tube à esai. Placer ce tube pendant 5 minutes au bain-marie bouillant. Refroidir. Examiner le tube face à une source lumineuse masquée aux yeux de l'observateur. Le filtrat doit rester parfaitement clair. Les filtrats provenant de certains laits aromatisés sont plus ou moins colorés, mais cette coloration ne gêne pas sensiblement l'observation. Avec les laits chocolatés, il faut prolonger pendant 8 ou 10 minutes le contact entre le lait et le sulfate d'ammonium et agiter plusieurs fois. Le développement d'un trouble correspond à une réaction positive et signifie une action thermique insuffisante.

Si une réaction négative nous apporte l'assurance que le lait a été soumis à un degré de chauffage que nous considérons comme un minimum exigible dans tous les cas, un tel résultat n'implique nullement que le lait soit stérile. Sur notre total de 378 prélèvements, nous n'avons rencontré aucun résultat positif alors que, en même temps, 79 échantillons se sont révélés non stériles aux épreuves d'étuvage.

Sur ce premier échantillon, nous déterminons également le pH, à l'électropotentiomètre. Le pH normal d'un lait stérilisé est de 6,4-6,6. Un pH inférieur à 6,1 indique d'emblée un lait altéré même si aucune modification n'est visible. D'autre part, ce pH initial constituera l'indication de référence à laquelle nous comparerons le pH noté après étuvage.

A défaut de pouvoir déterminer le pH, le dosage de l'acidité est à effectuer. Toutefois, le titrage de l'acidité est quelquefois difficile, sinon impossible, en raison de la coloration présentée par certains laits aromatisés. Ajoutons que l'acidité d'un lait stérilisé est sensiblement de 18° Dornic, c'est-à-dire de 1,8 gr. en acide lactique par litre.

(1) Rapport annuel sur les opérations des Services Sanitaires Vétérinaires de Paris et du Département de la Seine pendant l'année 1955, page 67.

SECOND ÉCHANTILLON.

Le second échantillon est placé à l'étuve à 55° C. Chaque jour, pendant 10 jours, le flacon est examiné, puis secoué et replacé dans l'étuve.

A. — Si une altération physique du contenu est constatée (coagulation, peptonification, protéolyse), l'incubation est interrompue. Un ml. du contenu du flacon est prélevé aseptiquement et transféré dans 60 ml. de lait écrémé stérile préparé à partir d'un lait sec. Nous avons employé, avec les mêmes bons résultats, le Bacto-skim-milk déshydraté Difco et le lait écrémé en poudre « instantané » de la Société « France-Lait » (Saint-Martin-Belleroche, Saône-et-Loire). Le lait écrémé reconstitué est distribué par fractions de 60 ml. en fioles d'une contenance de 150 cc., bouchées au coton et capuchonnées de papier cellophane. Le milieu est tyndallisé pendant 3 jours consécutifs, par séjour d'une heure dans la vapeur fluente. Le lot est éprouvé 10 jours à 55° avant d'être mis en service.

Ainsi une fiole de lait écrémé stérilisé a été inoculée avec 1 ml. de l'échantillon altéré. La fioleensemencée est, elle-même, placée à l'étuve à 55° et examinée tous les jours pendant 10 jours, ou retirée dès coagulation du contenu, en cours d'étuvage. Disons tout de suite que nous n'avons jamais constaté qu'un échantillon s'étant altéré au cours de l'étuvage précédent à 55° n'ait pas provoqué la même altération du lait écrémé après repiquage. Pourquoi alors exécuter systématiquement cette subculture dont le résultat confirme toujours celui de l'épreuve d'étuvage ? Parce que, lors des échanges de vues qui ont eu lieu au sujet des méthodes de contrôle des laits stérilisés, certains industriels avaient exprimé la crainte que le traitement subi par les laits stérilisés pût entraîner une certaine instabilité du produit traité, et que l'étuvage à 55° fût capable de provoquer des changements physiques en l'absence de tout développement microbien. Les 79 échantillons qui, dans nos expériences, avaient subi des altérations physiques visibles au cours de l'étuvage à 55° se sont tous révélés capables de provoquer la même altération de 60 fois leur volume de lait écrémé stérilisé, dans des conditions d'incubation identiques : le changement d'état physique était donc bien l'aboutissement d'un processus microbien dû à ce que ces laits « stérilisés » n'étaient pas stériles.

Nous croyons cependant qu'il est souhaitable de procéder à ce repiquage. En effet, on constate parfois, dans les laits aromatisés, une sédimentation au cours de l'étuvage : cette séparation pourrait être confondue avec une altération du contenu des flacons. Pour éviter toute équivoque, le repiquage en lait est donc indiqué. On a proposé d'autres épreuves de confirmation : frottis colorés, cultures dans d'autres milieux (nous avons nous-mêmes longtemps eu recours au milieu A.C. Difco).

Selon notre expérience, c'est le repiquage en lait écrémé qui fournit le meilleur critère, et nous proposons la règle : Toute altération de l'échantillon est d'origine microbienne si elle est transmissible par inoculation à un lait écrémé stérile, le rapport inoculum/milieu étant de 1 à 60.

B. — Si aucune altération ne s'est manifestée au cours des 10 jours d'incubation à 55°, le second échantillon est sorti de l'étuve et, lorsque son contenu s'est mis en équilibre de température avec la laboratoire, on prélève aseptiquement une fraction de ce contenu, environ 5 ml., qu'on place en réserve dans un tube stérile. Sur une autre fraction, on exécute la détermination du pH et on compare le résultat avec le pH initial obtenu 10 jours plus tôt sur le premier échantillon. Si le pH n'a pas varié sensiblement, on considère le résultat de l'épreuve d'étuvage à 55° comme satisfaisant. Dans le cas contraire, l'échantillon est regardé comme suspect et on ensemence, avec 1 ml. de la fraction réservée, une fiole de lait écrémé stérile comme dans le cas d'une altération visible. Si aucun changement physique ne se produit dans cette seconde culture au cours de 10 jours d'incubation à 55°, on considère le résultat de l'étuvage à 55° comme satisfaisant. Dans le cas contraire, l'échantillon est considéré comme non-stérile.

Par « variation sensible », nous entendons un écart égal ou supérieur à 0,2. Toutefois, l'importance de cet écart, pour être valable, est nécessairement en rapport avec le degré de précision dans les mesures offert par le laboratoire intéressé. Pour retenir cet écart de 0,2, il est obligatoire de procéder à des étalonnages fréquents et, par exemple, d'installer un régulateur de courant.

S'il s'agit de l'acidité titrable, un écart de plus de 2° Dornic (soit 0,02 % en acide lactique) permet la même conclusion.

TROISIÈME ÉCHANTILLON.

Le troisième échantillon est placé dans l'étuve à 32°. Cette épreuve d'étuvage se déroule exactement de la même façon que l'épreuve à 55°, sauf qu'elle est poursuivie pendant 20 jours. Si le contenu d'un flacon vient à présenter, au cours de l'étuvage, une altération physique visible, ou accuse, au terme de cet étuvage, comme précédemment, une variation du pH par rapport au pH initial du premier échantillon (ou, à défaut, la même variation dans l'acidité titrable), on procède comme dans le cas du second échantillon, à cette réserve près que la culture de confirmation est incubée pendant 20 jours à 32°.

Observation générale.

Une évidence s'impose dès l'abord : les laits, qu'ils soient entiers, demi-écrémés ou écrémés, et les laits aromatisés aux fruits, à la vanille, au sucre, au caramel, au café, ont à peu près le même comportement dans les épreuves d'étuvage. Les résultats peuvent donc être rapportés globalement pour toutes ces catégories. Par contre, les laits chocolatés se distinguent fréquemment par leur inaptitude à résister à un étuvage de 10 jours à 55°. Précisons que cette observation vise le lait chocolaté en général et non pas toutes les marques de lait chocolaté ; nous reconnaissons que quelques rares industriels ont su résoudre le problème, et livrent, sur les marchés, des laits stérilisés chocolatés capables de donner des résultats sinon constants, du moins généralement satisfaisants lors de l'étuvage à 55°.

L'ensemble des résultats obtenus est groupé dans le tableau ci-après, concernant 378 prélèvements de laits stérilisés, chaque prélèvement comportant trois échantillons.

Catégorie	Nombre d'échantillons examinés dans chacune des trois épreuves	Epreuve de turbidité Résultats positifs (défavorables) %	Etuvage 20 jours à 32° Résultats positifs (défavorables) %	Etuvage 10 jours à 55° Résultats positifs (défavorables) %
Laits stérilisés et laits stérilisés aromatisés de tout arôme, sauf chocolat.	291	0 %	0 %	11 %
Laits stérilisés chocolatés.	87	0 %	0 %	53 %

De cet ensemble, nous retiendrons les points suivants :

1° L'épreuve de turbidité conduit à une action préventive très précieuse, puisque, par elle, il nous est possible d'écarter très rapidement des laits qui ne sont *certainement pas stériles*.

2° Ainsi qu'il a été reconnu par ailleurs, ce sont les laits chocolatés qui donnent de loin la plus forte proportion des résultats défavorables à l'analyse.

3° Bien que l'épreuve d'étuvage à 55° démontre qu'un assez grand nombre d'échantillons de « laits stérilisés » ne sont pas stériles, l'épreuve d'étuvage à 32° est constamment négative, même pour les laits chocolatés. Il convient d'en tirer deux déductions :

a) Un lait « stérilisé » peut ne pas être stérile et cependant présenter une bonne « tenue », c'est-à-dire une bonne aptitude à se conserver dans des conditions habituelles.

b) L'épreuve d'étuvage à 32° n'est pas utile, puisqu'elle ne fait aucune différence entre des laits « stérilisés » parfaitement traités et aptes à une conservation très longue sinon indéfinie, et des laits manifestement non stériles.

CONCLUSION

En vue de l'inspection des laits « stérilisés », nous proposons de mettre en œuvre, selon les modalités opératoires exposées (chaque prélèvement comprenant *deux* échantillons) :

1° L'épreuve de turbidité ;

2° La détermination du pH ou, à défaut, la mesure de l'acidité titrable lorsque la lecture n'en est pas empêchée par la coloration du lait aromatisé ;

3° L'épreuve d'étuvage à 55° poursuivie pendant 10 jours au maximum, complétée éventuellement par une seconde détermination du pH et un ensemencement en lait écrémé stérile.

Ce protocole est, sans aucun doute, perfectible ; au surplus, il ne donne pas la réponse catégorique que l'on pourrait désirer.

Cependant, nous avons estimé qu'il permettait d'aboutir, lorsque la réponse obtenue est favorable, à une *très forte présomption de bonne qualité hygiénique* des produits examinés.

D'autre part, la signification des résultats notés est sans ambiguïté.

Faute de l'absolu, idéal inaccessible en la circonstance, une telle appréciation nous paraît représenter un terme valable en matière d'hygiène alimentaire.

DISCUSSION

M. DRIEUX. — Il y a deux points que je voudrais élucider. En premier lieu, je désirerais savoir si c'est toujours sous l'influence de bactéries acidifiantes que l'on observe des modifications dans le lait mis à l'étuve.

En second lieu, me référant à l'examen bactériologique des viandes, je suis surpris de vous voir faire allusion à l'examen direct par coloration des frottis.

Peut-être répondrez-vous que sur un frottis on ne peut distinguer les germes antérieurs à l'étuvage de ceux qui sont apparus après cette opération. Cependant, une comparaison entre deux échantillons, l'un avant, l'autre après étuvage, pourrait tout de même être utile en la circonstance.

M. THIEULIN. — Il n'y a pas de superposition des deux bases d'appréciation concernant, l'une le pH, et l'autre la culture. Il s'agit de laits qui ont toujours été très fortement chauffés et dans lesquels la flore lactique banale a été détruite. Certains des germes survivants sont capables d'une action inverse. En utilisant l'ensemencement en lait écrémé stérile, et, s'il n'y a pas d'altération apparente, le pH, nous élargissons les bases de notre investigation.

En ce qui concerne les frottis, l'expérience nous a montré que si en dix jours il n'y a pas d'altération apparente, ni de modification du pH, les frottis ne donnent absolument aucun renseignement complémentaire valable.

M. GUILLOT. — Je voudrais poser deux questions à M. THIEULIN. La première question est relative à la conduite à tenir de la part du laboratoire qui vient de procéder à ces examens, que nous résumons : première épreuve, celle de turbidité, vous condamnez un lait insuffisamment chauffé ; dans la seconde épreuve à 55°, au bout de dix jours vous avez soit une modification du pH, soit de l'acidité. Dans les deux cas, condamnez-vous le lait ?

M. THIEULIN. — Il y a encore le repiquage à partir du lait reconnu suspect.

M. GUILLOT. — Et si cet ensemencement est négatif, que faut-il conclure ?

M. THIEULIN. — Jusqu'à présent, nous n'avons jamais eu de résultat négatif dans ce cas.

M. GUILLOT. — Pour un lait qui avait présenté une altération visible ou une variation du pH, mais à l'inverse, si ces modifications ne sont pas notées et que l'ensemencement soit positif ?

M. THIEULIN. — Jusqu'à présent, nous n'en avons pas trouvé de positif et c'est pourquoi le protocole proposé nous semble suffisant.

M. GUILLOT. — Les tubes de verre que vous avez ensemencés, est-ce que vous les mettez à l'éluve à 32° d'abord et ensuite vous les remettez à 55° ?

M. THIEULIN. — Nous les mettons à 55° seulement ; nous n'avons rien obtenu à 32°.

M. GUILLOT. — Alors, comme le dit M. DRIEUX, c'est la flore thermophile que vous recherchez ?

M. THIEULIN. — C'est logique pour des laits qui ont été chauffés très fortement, même s'ils n'ont pas été stérilisés.

M. GUILLOT. — Deuxième question. Compte tenu de votre examen et suivant les résultats, quelle réponse doit-on donner sur la conservation possible de ce lait ? Car c'est ce que l'on nous demande : peut-on garder ce lait deux mois en magasin ? à quel moment le mettre en consommation ? C'est ce qui se produit en Allemagne pour le ravitaillement de nos économats qui sont approvisionnés en lait stérilisé. Les gérants demandent aux vétérinaires, en fonction de l'examen qui a été pratiqué, combien de temps peut-on garder ces laits en magasin. Par définition, un lait stérile devrait évidemment se conserver indéfiniment, comme une boîte de conserve, mais comme vous l'avez dit très justement, la loi de 1924 est inapplicable parce que le lait n'est pas stérile dans les conditions actuelles de l'intervention industrielle. Alors, que faut-il répondre ?

M. THIEULIN. — Le problème de la stérilité du lait a été mal posé dans la pratique commerciale, mal défini, et le terme « absolu » actuellement employé se révèle très malheureux. Il n'y a actuellement qu'une façon d'aboutir à un lait, si non réellement stérile, du moins à un lait de longue conservation : c'est de le stériliser en boîtes métalliques soudées, parce que la boîte métallique soudée permet par une stérilisation violente du contenu, une température élevée pendant un temps très court. L'erreur actuelle consiste à vouloir présenter un lait stérilisé dans des flacons de verre qui ne peuvent pas être traités de façon adéquate pour tendre vraiment vers cette stérilisation et qui ont en outre l'inconvénient de ne pas être opaques alors qu'ils sont de par ailleurs d'un nettoyage aléatoire aux fins de réemploi.

Un lait « stérilisé » contenu en bouteilles de verre capsulées, est à notre sens toujours suspect parce que l'éclanchéité n'est pas garantie.