ADAMOS

Un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers : Adaptation, développement et appropriations des méthodes omiques à des fins d'écologie microbienne

Avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale développement agricole et rural CASDAR

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
Liberté Égalité Fraternité

haute savoie le Département

SAVOIE LE DÉPARTEMENT

Action 2 : Tester des démarches méthodologiques autour de l'ADN via l'application à des cas terrains

Synthèse des résultats

Cas terrain : Beaufort

ceraq Centre de ressources pour l'agriculture de qualité et de montagne

cnaol CONSEIL NATIONAL DES APPELLATIONS D'ORIGINE LAITIÈRES

COMTÉ

ENILV La Roche sur Foron

ctfc

ACTALIA

Pôle fromager AOP Massif central

INP PURPAN

UR ABTE EA-4651 Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements

UNICAEN

GENOSCOPE

cea

INRA SCIENCE & IMPACT

FROMAGE BEAUFORT

réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

Savoie – les questionnements

Certaines pratiques d'ensemencement ont pour objectif de **favoriser l'expression des microflores**

Comprendre…

l'impact de pratiques d'**ensemencement**

Préparation d'**ensemencements indigènes**

Beaufort
Abondance
Emmental de Savoie

Le **report des laits** en amont de l'ensemencement

Tome des Bauges
Chevrotin

Pratiques d'ensemencement avec des **maturations** plus ou moins longues

Tomme de Savoie
Raclette
Reblochon

Questionnement

La culture traditionnelle de ferments est complexe et peut présenter des particularités selon les ateliers.

Certaines pratiques d'ensemencement ont pour objectif de **favoriser l'expression des microflores**

Préparation d'**ensemencements indigènes**

Principe : macération de caillette sur recuite puis incubation à 45°C jusqu'à obtention d'une acidité Dornic de 110.

→ **Rôle de ferment et de présure**

image : Flaticon.com

Questionnement

La culture traditionnelle de ferments est complexe et peut présenter des particularités selon les ateliers.

Certaines pratiques d'ensemencement ont pour objectif de **favoriser l'expression des microflores**

Préparation d'**ensemencements indigènes**

Quelle diversité des ferments traditionnels ?

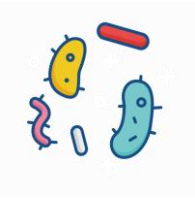
Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication et de l'affinage ?

Quels sont les impacts de la culture traditionnelle de ferments sur la qualité organoleptique des fromages ?

image : Flaticon.com

Matériel et méthode

Analyses réalisées



Quelle diversité des ferments traditionnels ? → Analyses pasteuriennes
Metabarcoding sur les bactéries (16S)

Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication et de l'affinage ? → Analyses pasteuriennes
Metabarcoding sur les bactéries (16S)

Quels sont les impacts de la culture traditionnelle de ferments sur la qualité organoleptique des fromages ? → Notation par un jury (note du groupe)

Plan d'expérience

Préparation d'**ensemencements indigènes**

La culture traditionnelle de ferments est complexe et peut présenter des particularités selon les ateliers.

7 ateliers **laitiers**

ateliers G à M

✖

4 suivis

2 suivis x 2 cuves

-1 pour l'atelier L

6 ateliers **fermiers**

ateliers N à S

✖

2 suivis

-1 pour l'atelier S

+1 pour l'atelier Q

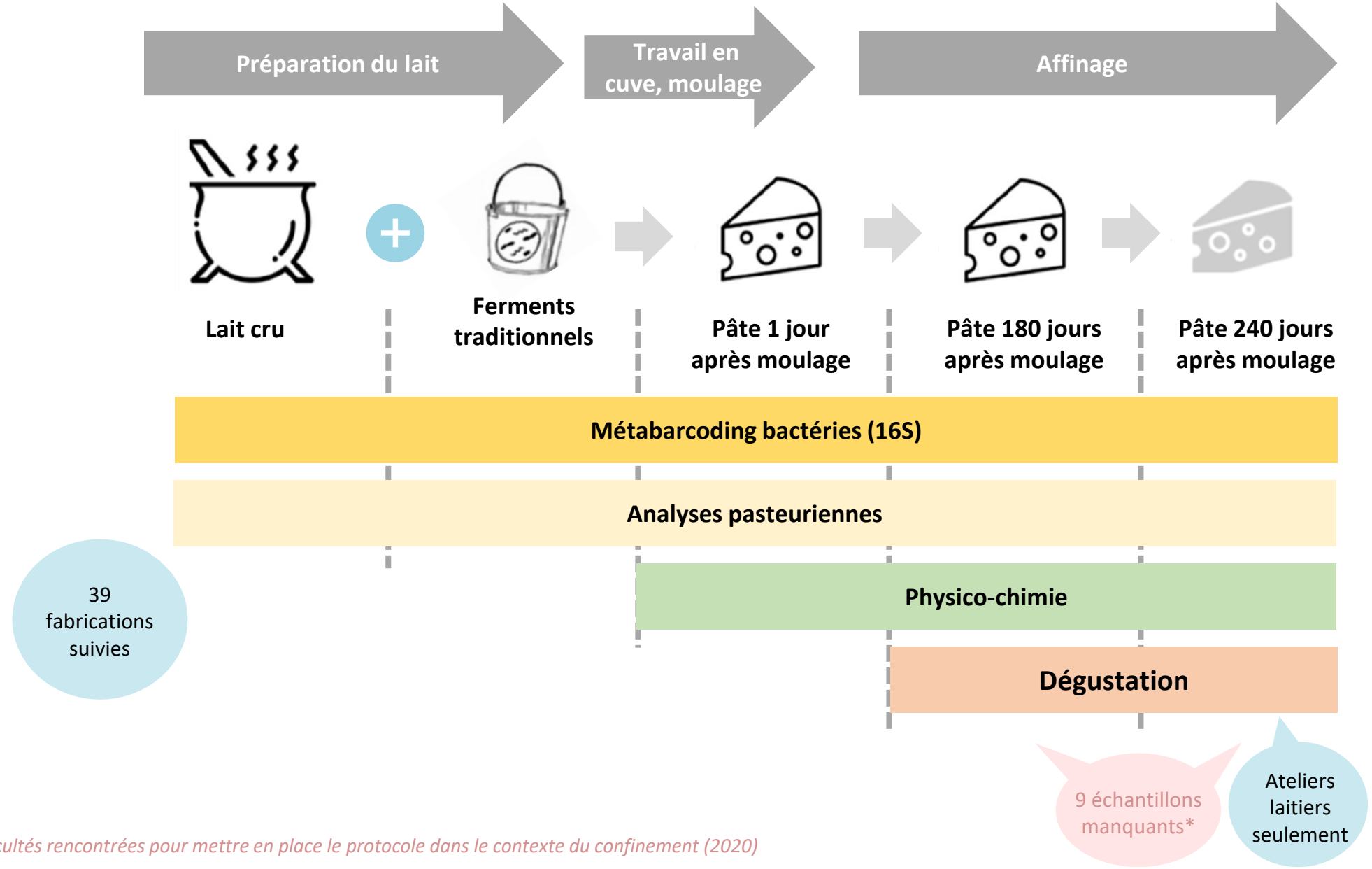
=

39 suivis de fabrication

Période estivale 2019

- du 22 juillet au 1er octobre
- en moyenne 33 jours entre 2 suivis (± 19,5j)

Prélèvements et analyses



** Des difficultés rencontrées pour mettre en place le protocole dans le contexte du confinement (2020)*

Résultats

Quelle diversité des ferments traditionnels ?

Quelle diversité des ensemencement indigènes ?

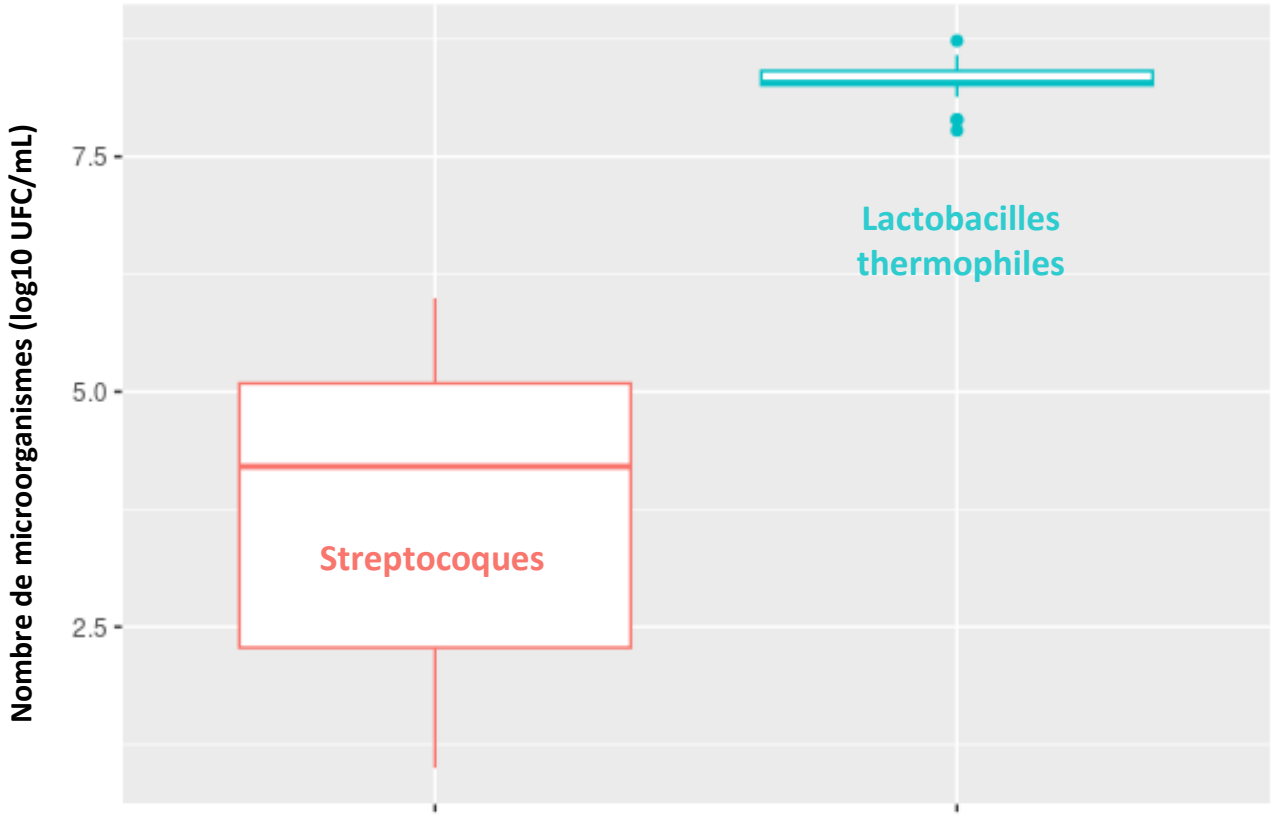
*Les analyses pasteuriennes permettent de **dénombrer** certains groupes microbiens (abondances absolues).*

Les ferments traditionnels sont des milieux acides (114°D ; σ = 12), sélectifs, qui permettent de favoriser des microflores d'intérêt (ex. lactobacilles thermophiles).

Suite de la présentation : résultats de métabarcoding, avec la détection des microorganismes présents à une échelle infra-spécifique.

Dénombrements de groupes microbiens dans les ferments

N = 39



Quelle diversité des ensemencements indigènes ?

103 **espèces** observées dans l'ensemble des ferments (29 en moyenne dans un échantillon).

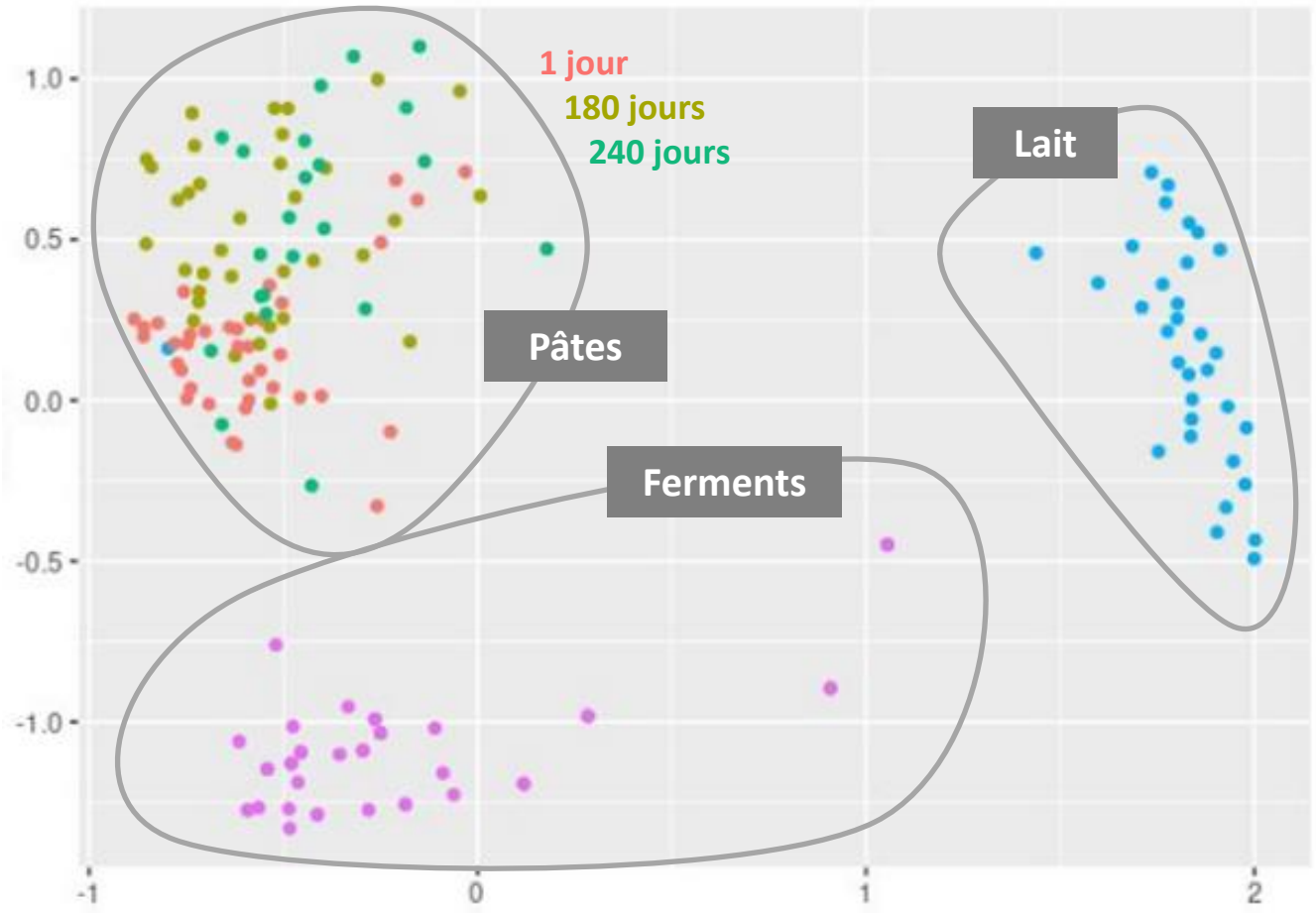
Il existe une variabilité de la composition bactérienne des ferments, qui ne sont pas tous semblables.

Quelles différences ?

Quels points communs ?

Microbiotes bactériens des échantillons collectés (NMDS)

N = 167



Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) selon les distances de Bray Curtis entre les compositions bactériennes des échantillons (métabarcoding 16S), selon les types d'échantillons prélevés (couleur).

Quelle diversité des ensemencement indigènes ?

Quels points communs entre les microbiotes des ferments ?

4 **espèces** présentes dans tous les échantillons (sur 103 espèces observées dans l'ensemble des ferments)

Lactococcus lactis, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus thermophilus (qui est très peu présent)*

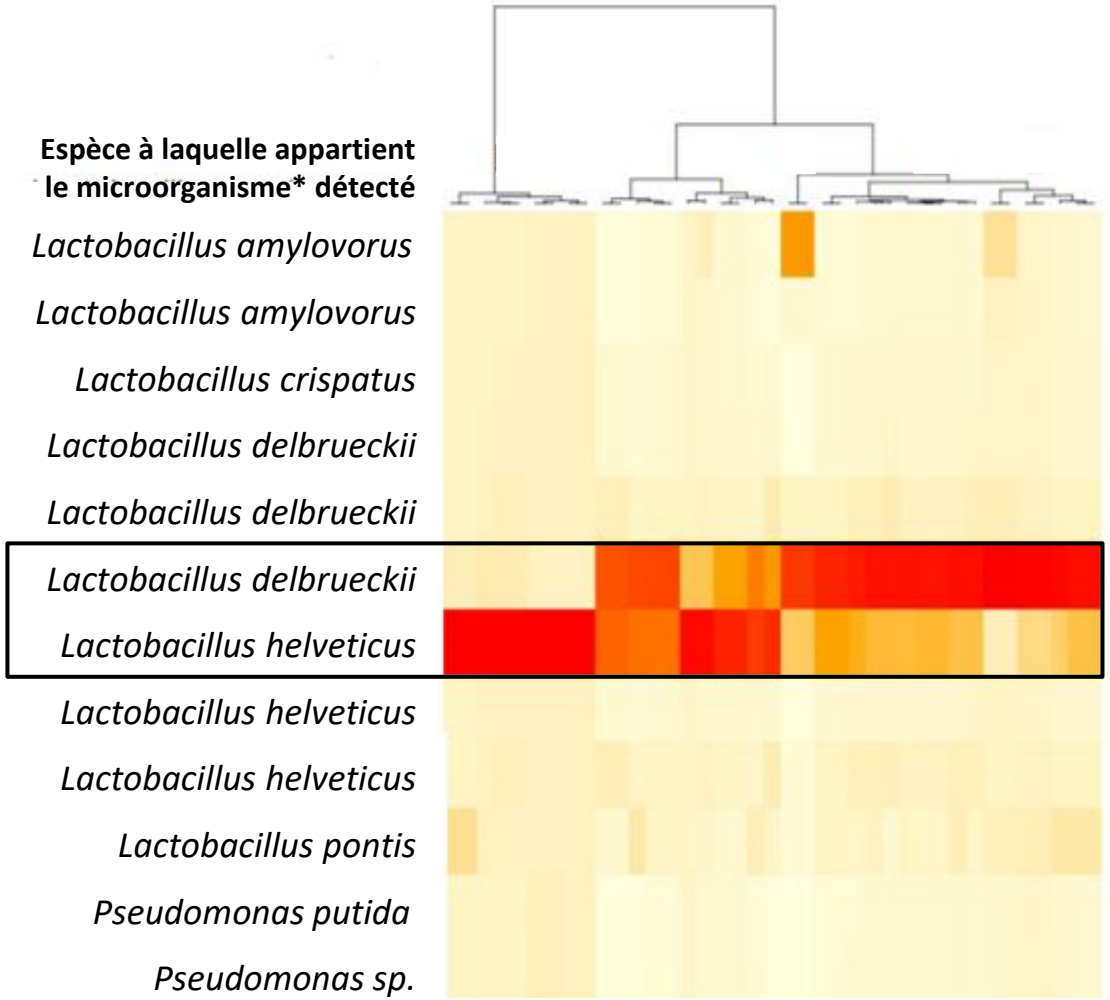
Deux microorganismes ont tendance à être prépondérants dans les ferments traditionnels étudiés : ils appartiennent aux espèces *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus helveticus.*

Attention : plusieurs microorganismes* peuvent appartenir à la même espèce mais avoir des prépondérances différentes dans les ferments.

Heatmap - Clustering par méthode Ward, sur matrice de distances de Bray Curtis.

Abondances relatives des bactéries dans les ferments*

*N = 39 ; *OTU les plus abondantes dans l'ensemble des ferments*



Quelle diversité des ensemencement indigènes ?

Quelles différences en termes de composition bactérienne selon les groupes de ferments ?

… mais les **équilibres** entre ces deux microorganismes prépondérants ne sont pas les mêmes d'un groupe de ferment à un autre.

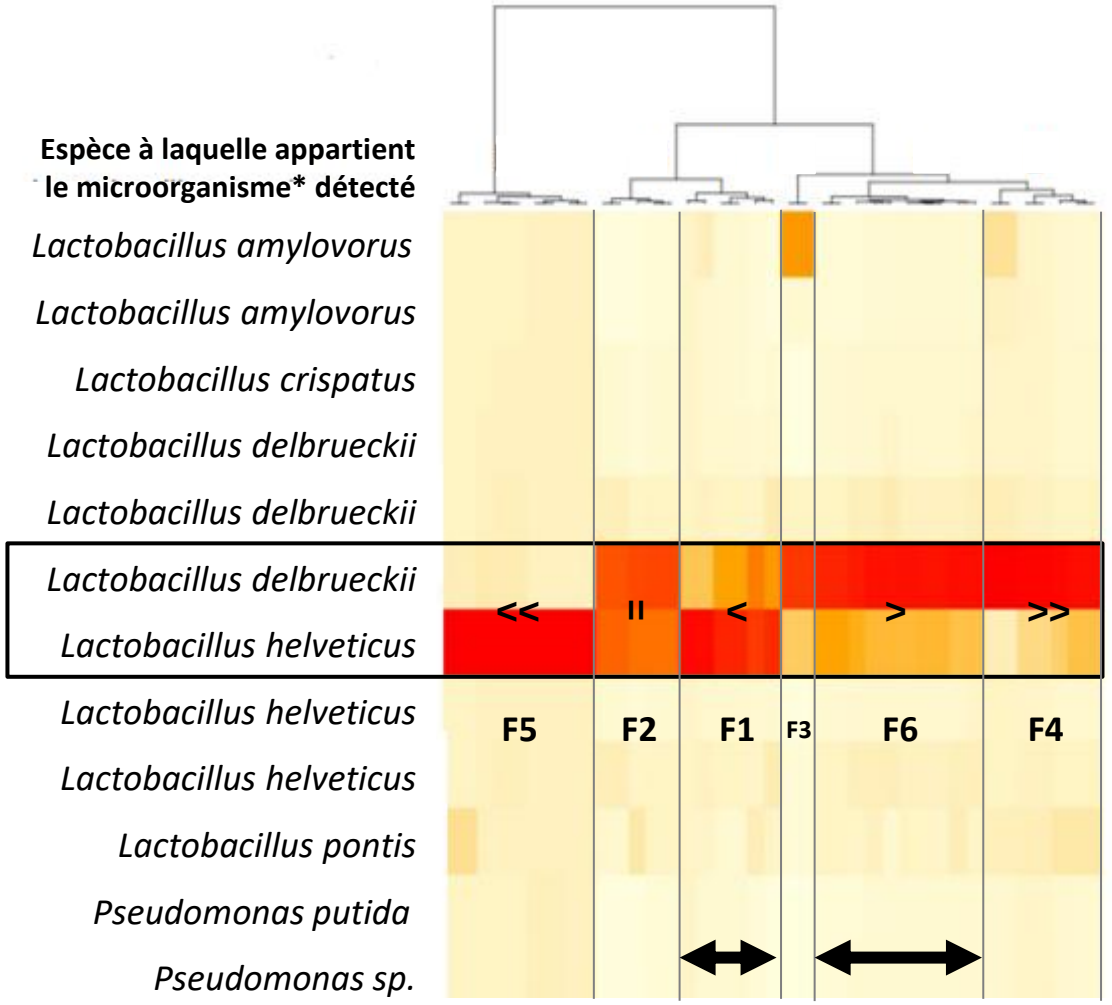
Par ailleurs, les deux ferments du groupe F3, présentent la particularité que *Lactobacillus amylovorus* est plus abondant que *L. helveticus.*

Attention : plusieurs microorganismes peuvent appartenir à la même espèce mais avoir des prépondérances différentes dans les ferments.

Heatmap - Clustering par méthode Ward, sur matrice de distances de Bray Curtis.

Abondances relatives des bactéries dans les ferments*

*N = 39 ; *OTU les plus abondantes dans l'ensemble des ferments*



Pas le même nombre d'échantillons selon les groupes

Quelle diversité des ensemencement indigènes ?

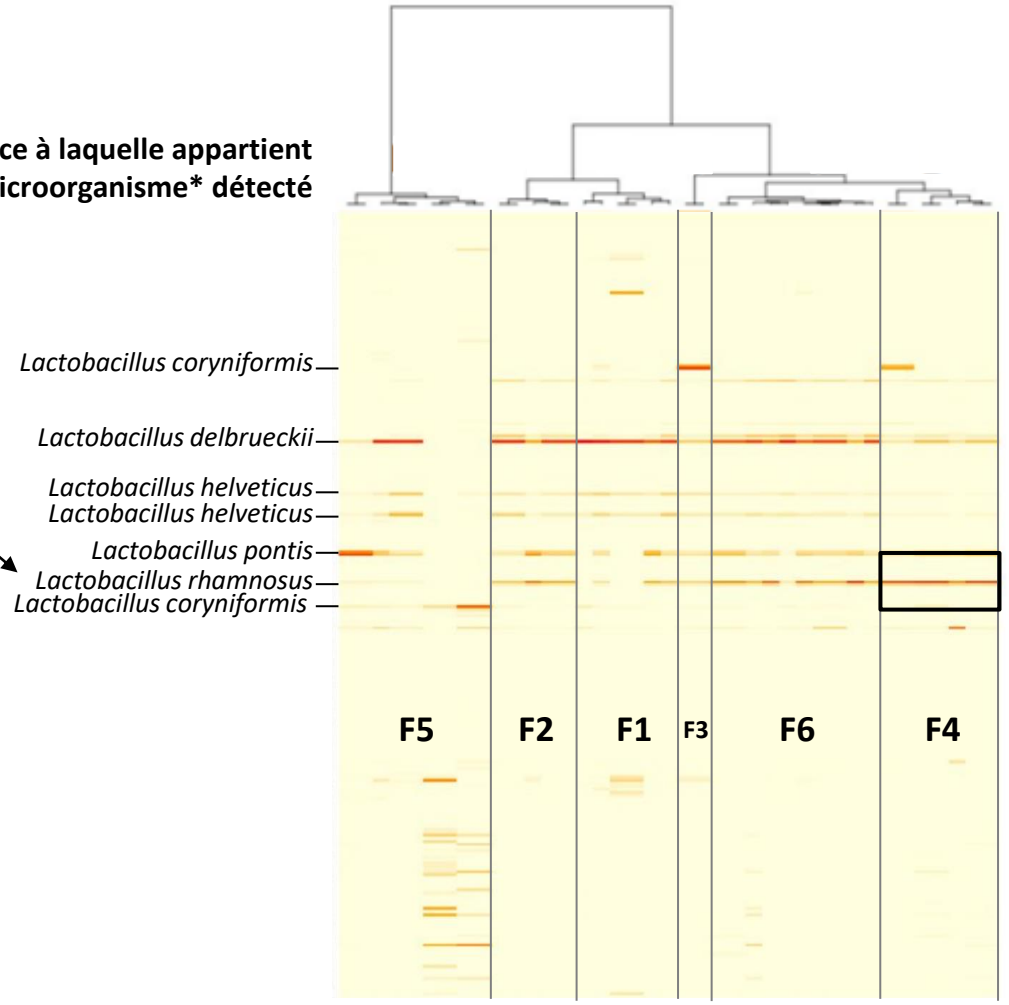
Quelles différences en termes de composition bactérienne selon les groupes de ferments ?

Des différences existent aussi pour **certains microorganismes minoritaires.**

Par exemple un microorganisme de l'espèce *Lactobacillus rhamnosus* est plus abondants dans les ferments du groupe F4 que dans les autres ferments.

Abondances relatives des bactéries dans les ferments*

*N = 39 ; *OTU les moins abondantes dans l'ensemble des ferments*



Attention : les microorganismes morts peuvent être détectés (metabarcoding). Or, le milieu et les conditions de culture des ensemencements sont très sélectifs.

Quelle diversité des ensemencement indigènes ?

Est-ce qu'un groupe de ferment donné est spécifique à un atelier ?

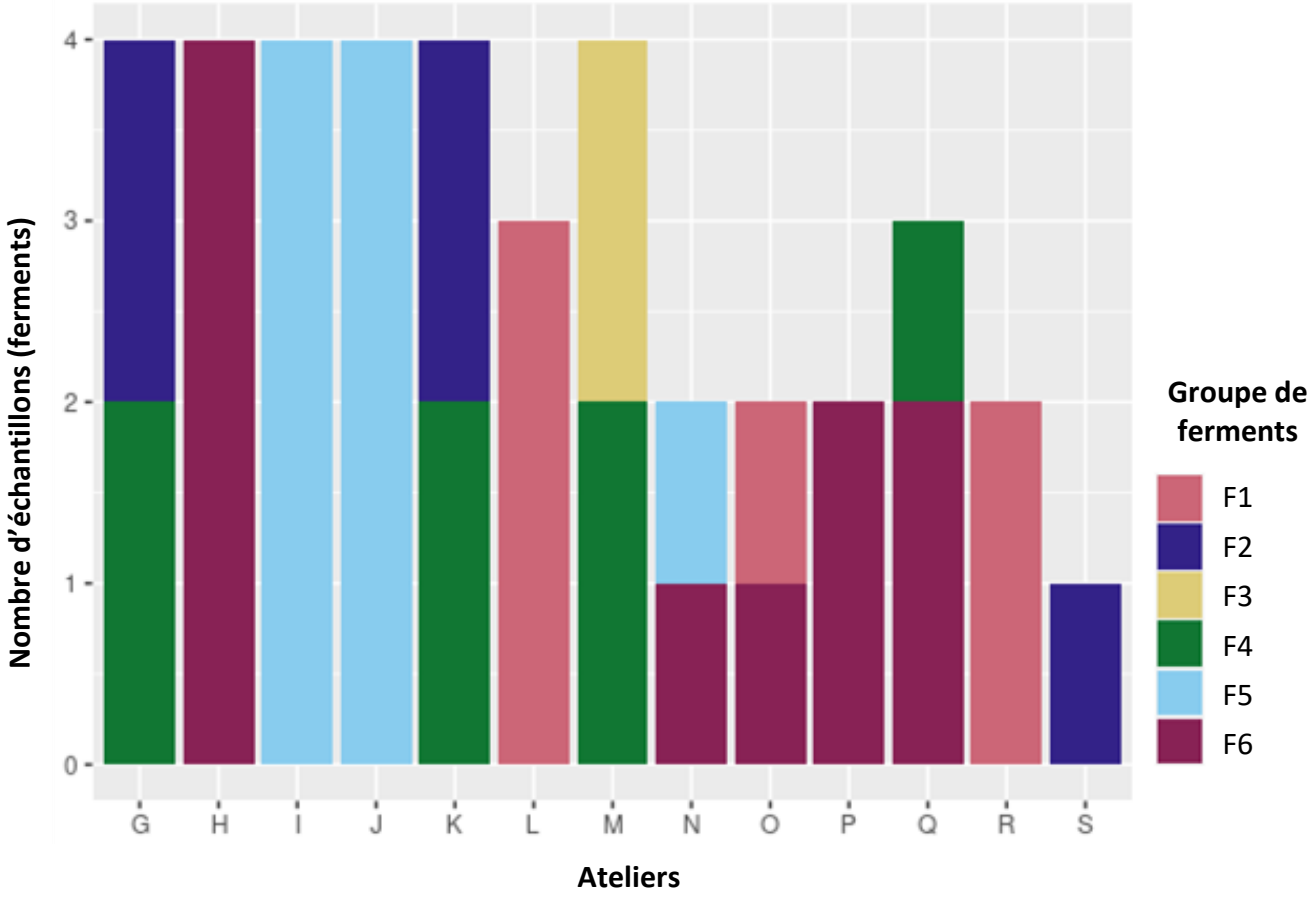
Non.

Les ferments ont des compositions bactériennes différentes selon les ateliers et parfois même au sein de l'atelier.

Chaque groupe de ferments est observé dans au moins 3 ateliers, à l'exception du groupe F3.

Nombre de ferments dans chaque atelier selon le groupe auquel ils appartiennent

N = 39



Résultats

Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication et de l’affinage ?

Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication ?

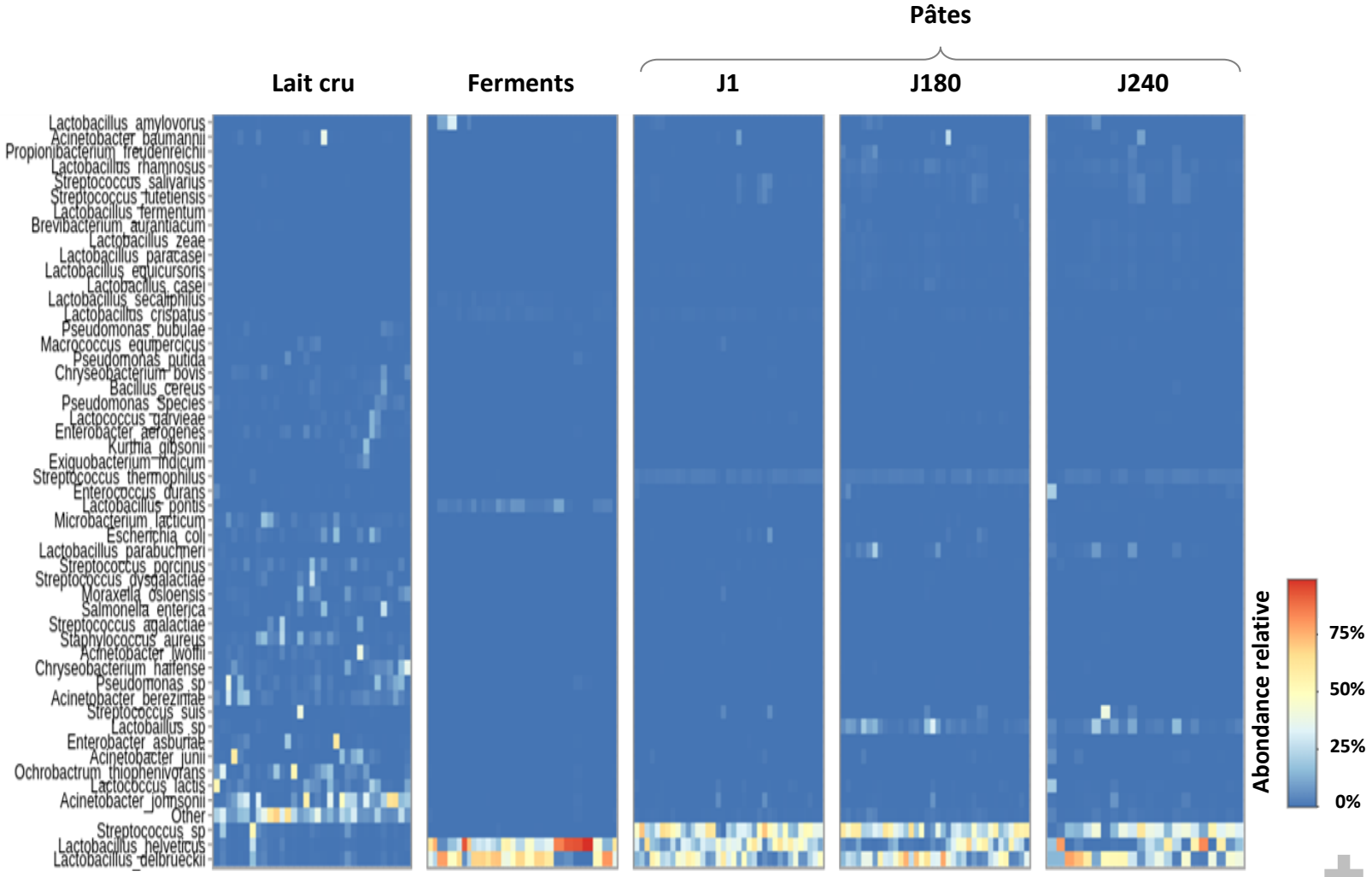
229 **espèces** observées dans l'ensemble des laits crus (91 en moyenne dans un échantillon).

Dans les fromages de J1 à J240, on retrouve la présence d'espèces du lait comme des *Lactobacillus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Lactococcus lactis*, *Ochrobactrum thiophenivorans*, *Acinetobacter junii.*

Attention : les microorganismes morts peuvent être détectés. Or, certains milieu (ferments) et le processus de fabrication peuvent être très sélectifs.

Abondances relatives des bactéries dans les échantillons*

*N = 167 ; *50 espèces les plus abondantes dans l'ensemble des échantillons*



Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication ?

Quelle évolution de la **richesse** bactérienne* au cours de la fabrication et de l'affinage ?

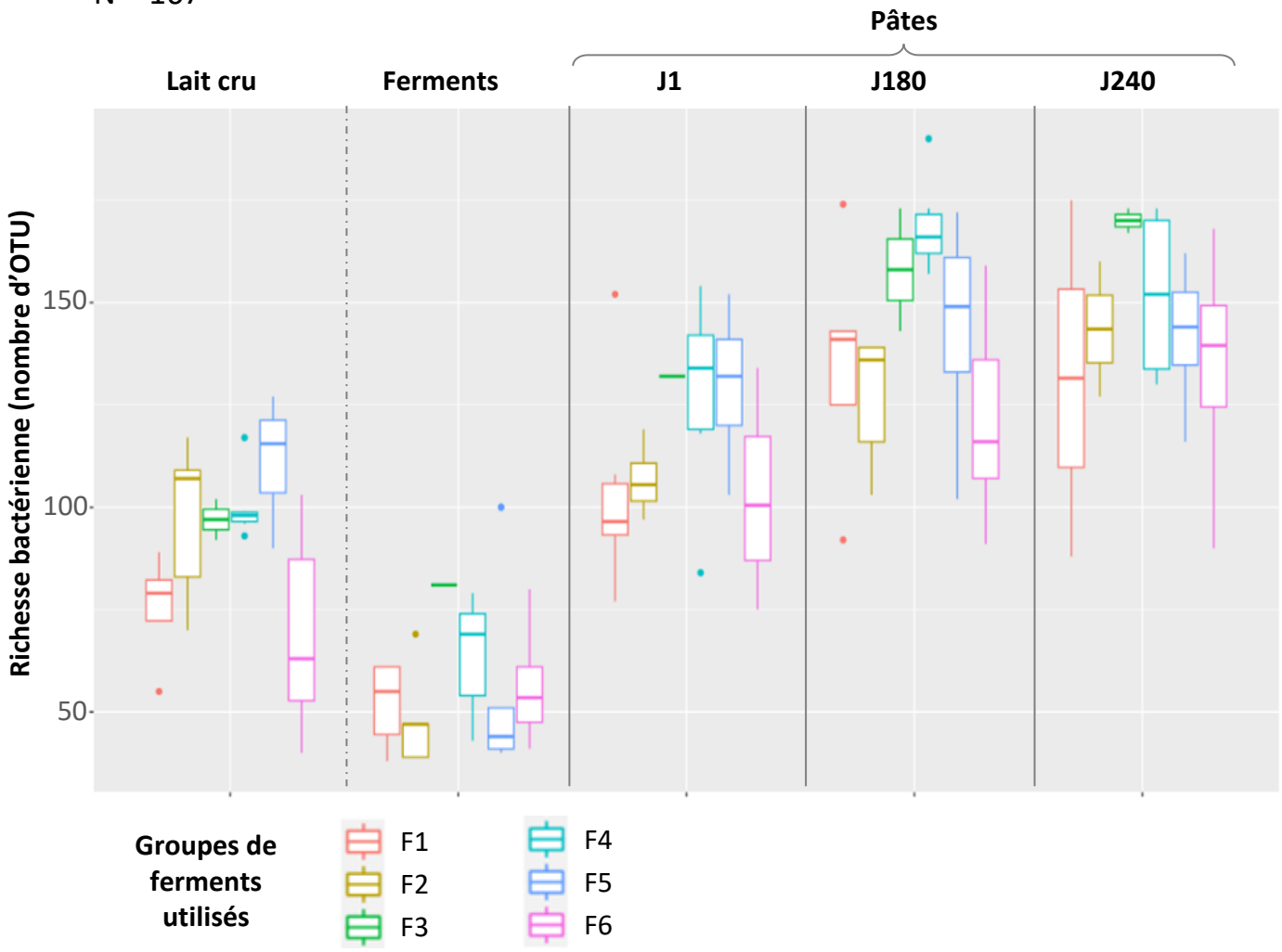
La richesse bactérienne* semble augmenter puis se stabiliser de 180 à 240 jours après moulage.

**Richesse bactérienne en nombre d'OTU*

Attention : les microorganismes morts peuvent être détectés. Or, certains milieu (ferments) et le processus de fabrication peuvent être très sélectifs.

Richesse bactérienne selon le groupe de ferments au cours de la fabrication*

N = 167



Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication ?

Quelle évolution de la **diversité** bactérienne* au cours de la fabrication et de l'affinage ?

Les laits en Beaufort sont plutôt riches et diversifiés, il n'y a pas d'espèces beaucoup plus abondante que les autres.

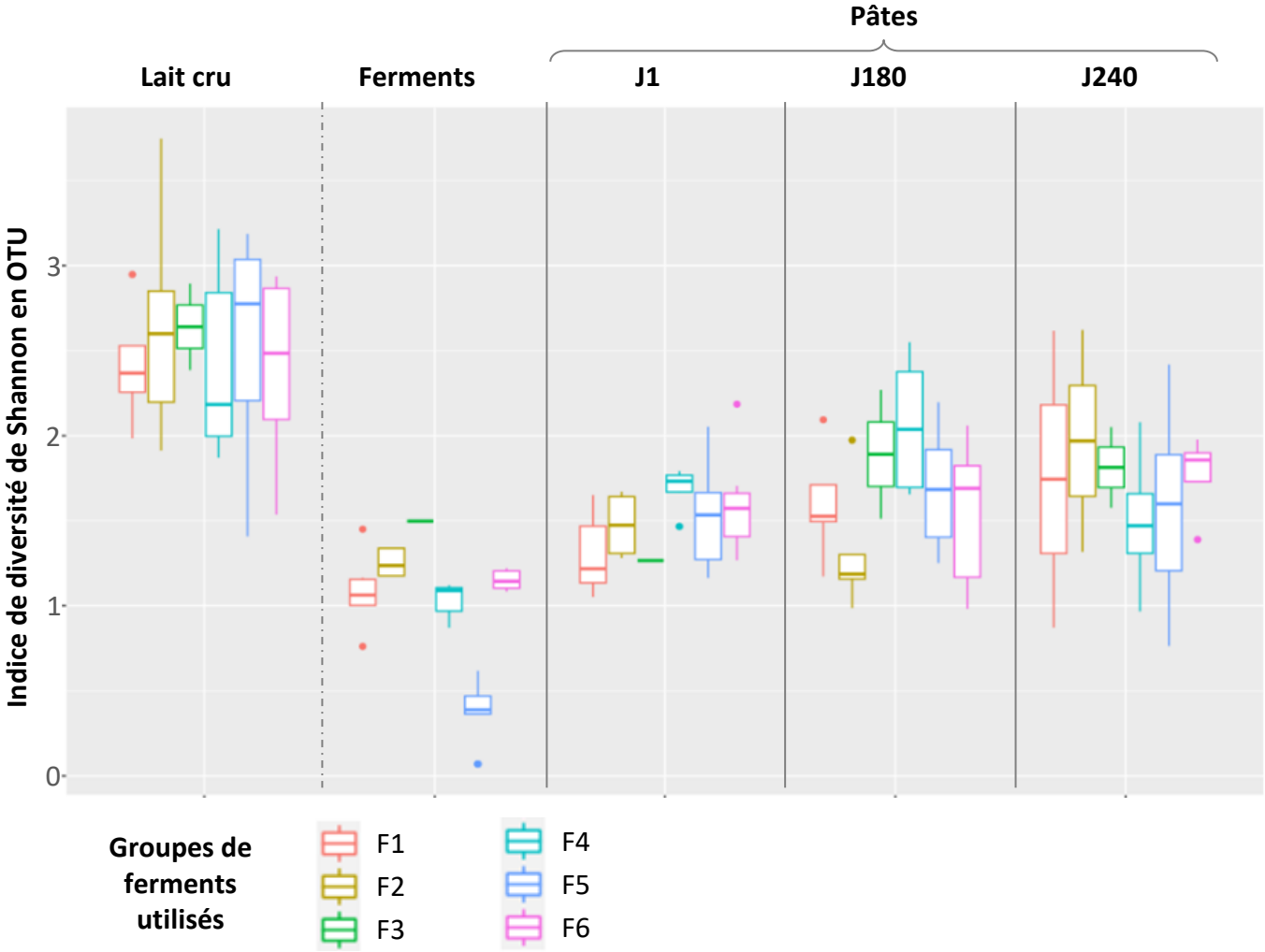
La diversité bactérienne* semble assez stable d'un jour après moulage à 240 jours après moulage.

**Indice de Shannon (OTU)*

Attention : les microorganismes morts peuvent être détectés. Or, certains milieu (ferments) et le processus de fabrication peuvent être très sélectifs.

Diversité bactérienne selon le groupe de ferments au cours de la fabrication*

N = 167



Résultats

Quels sont les liens entres les ferments cultivés traditionnellement et

la qualité organoleptique des fromages ?

Quel lien entre la diversité bactérienne des ferments et les qualités organoleptiques des fromages ?

Les fromages présentent-ils des caractéristiques organoleptiques différentes selon le groupe du ferment utilisé au moment de la fabrication ?

Oui, légèrement.

Les fromages fabriqués avec des ferments du groupe F1 ont une diversité d'arômes plus importante et moins d'amertume.

	Groupe de ferments					
	F1	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**
Diversité d'arômes	+	+	−	+	−	
Amertume	+		+	−	−	+

Test du Chi2
+ signifie : plus de bonnes notes que le hasard
− signifie : plus de mauvaises notes que le hasard

Quel lien entre la diversité bactérienne des ferments et les qualités organoleptiques des fromages ?

Les fromages présentent-ils des caractéristiques organoleptiques différentes selon le groupe du ferment utilisé au moment de la fabrication ?

Et selon la diversité bactérienne des ferments ?

Oui, légèrement.

Les fromages fabriqués avec des ferments du groupe F1 ont une diversité d'arômes plus importante et moins d'amertume.

Groupe de ferments

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Diversité d'arômes	+	+	−	+	−	
Amertume	+		+	−	−	+

Test du Chi2
+ signifie : plus de bonnes notes que le hasard
− signifie : plus de mauvaises notes que le hasard

Quel lien entre la diversité bactérienne des ferments et les qualités organoleptiques des fromages ?

La **diversité aromatique** des fromages peut-elle être liée à la diversité bactérienne* des ferments ?

Oui.

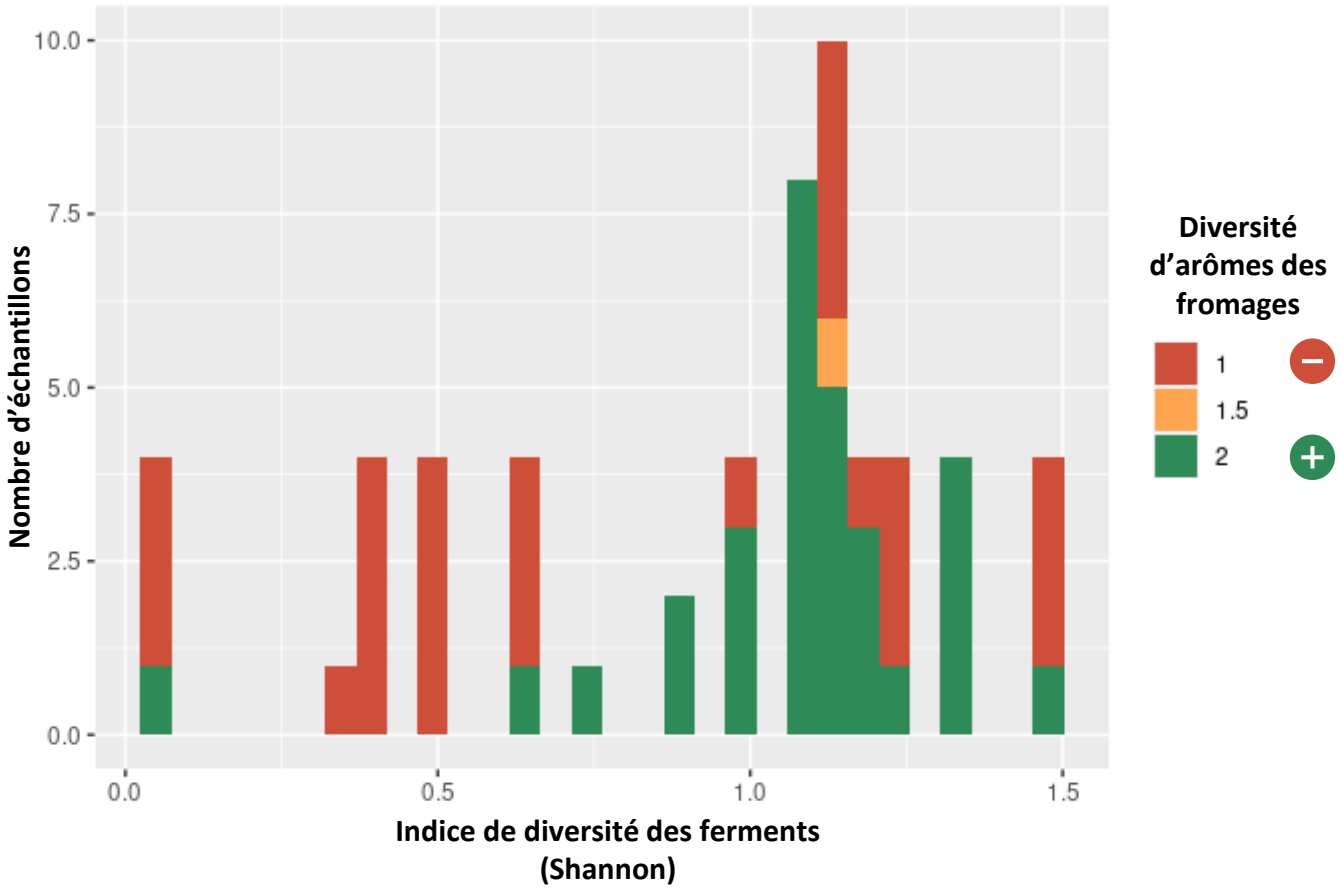
Les fromages issus des ferments qui ont des diversités bactériennes* plus élevées avaient plus de diversité aromatique.

*Indice de Shannon

Est-ce que le lien identifié est une relation de **cause à effet ?**
(de la diversité des ferments sur les qualités organoleptiques des fromages)

Quel niveau d'activité des microorganismes ?
Que produisent-ils ?

Diversité d'arômes dans les fromages selon la diversité bactérienne des ferments*
N = 58



Test de DUNN
+ signifie : valeur recherchée
− signifie : valeur à éviter

Quel lien entre la diversité bactérienne des ferments et les qualités organoleptiques des fromages ?

La **fermeté** des fromages peut-elle être liée à la diversité bactérienne* des ferments ?

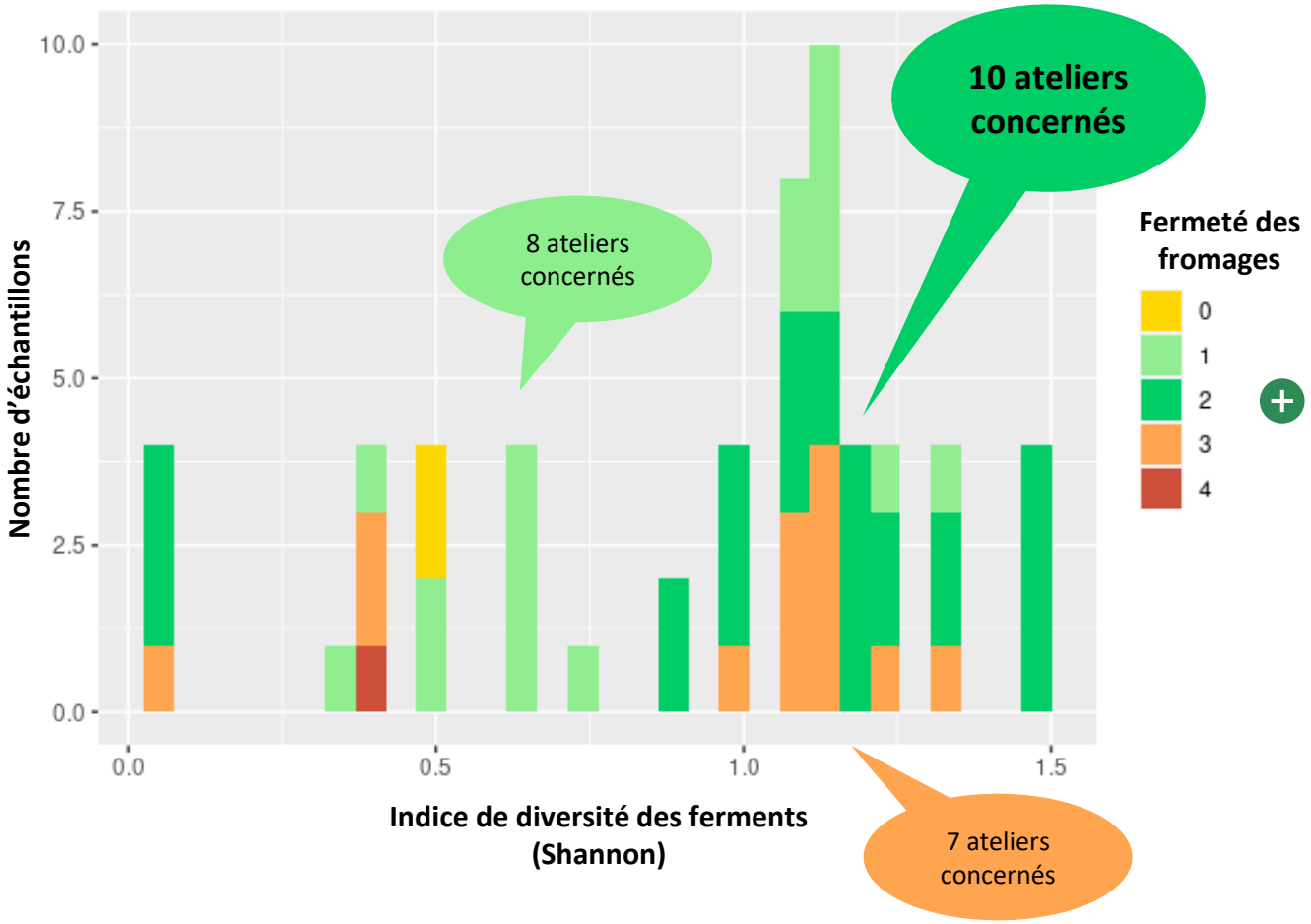
Les fromages issus des ferments qui ont des diversités bactériennes* plus élevées semblent avoir plus souvent la fermeté recherchée (note de 2).

*Indice de Shannon

Est-ce que le lien identifié est une relation de **cause à effet ?**

Fermeté de la texture des fromages selon la diversité bactérienne des ferments*

N = 58



Test du Chi2
+ signifie : valeur recherchée
− signifie : valeur à éviter

Conclusion

Point de vigilance : le milieu et les conditions de culture sont très sélectifs et les bactéries mortes peuvent être détectées (metabarcoding)

Conclusion

Quelle diversité des ferments traditionnels ?

- **103 espèces** de bactéries dont 4 communes à tous les ferments
- **2 bactéries** prépondérantes, dans des proportions variables
  appartenant aux espèces Lactobacillus delbrueckii et Lactobacillus helveticus
- **Des ferments ayant une composition bactérienne différentes selon les ateliers et parfois même au sein de l'atelier.**

Quelle évolution des microbiotes au cours de la fabrication et de l'affinage ?

- 229 espèces observées dans les laits crus ;
- A partir des laits, diversifiés, la richesse microbienne augmente puis semble se stabiliser après 180j d'affinage ;
- Certaines espèces des laits crus sont retrouvés dans les fromages.

Quels sont les impacts de la culture traditionnelle de ferments sur la qualité organoleptique des fromages ?

Des liens (corrélations) observés entre :

La diversité d'arôme

L'amertume

La texture

le groupe de ferment
(établi selon les bactéries présentes et leurs abondances relatives)

la diversité bactériennes des ferments
(Shannon)

Savoie – les questionnements

Certaines pratiques d'ensemencement ont pour objectif de **favoriser l'expression des microflores**

Comprendre…

Préparation d'**ensemencements indigènes**

Beaufort
Abondance
Emmental de Savoie

l'impact de pratiques d'**ensemencement**

POSTERS

Le **report des laits** en amont de l'ensemencement

Tome des Bauges
Chevrotin

Pratiques d'ensemencement avec des **maturations** plus ou moins longues

Tomme de Savoie
Raclette
Reblochon

Extraits des posters

Tome des Bauges

Le **report des laits** en amont de l'ensemencement

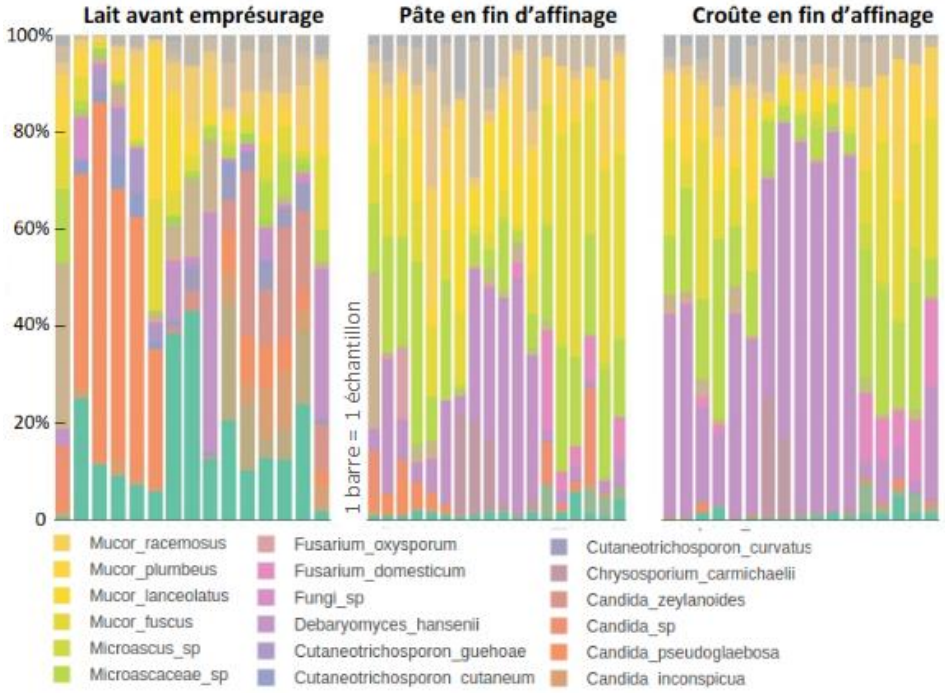
Des spécificités fortes de chaque atelier de fabrication

Tomme de Savoie

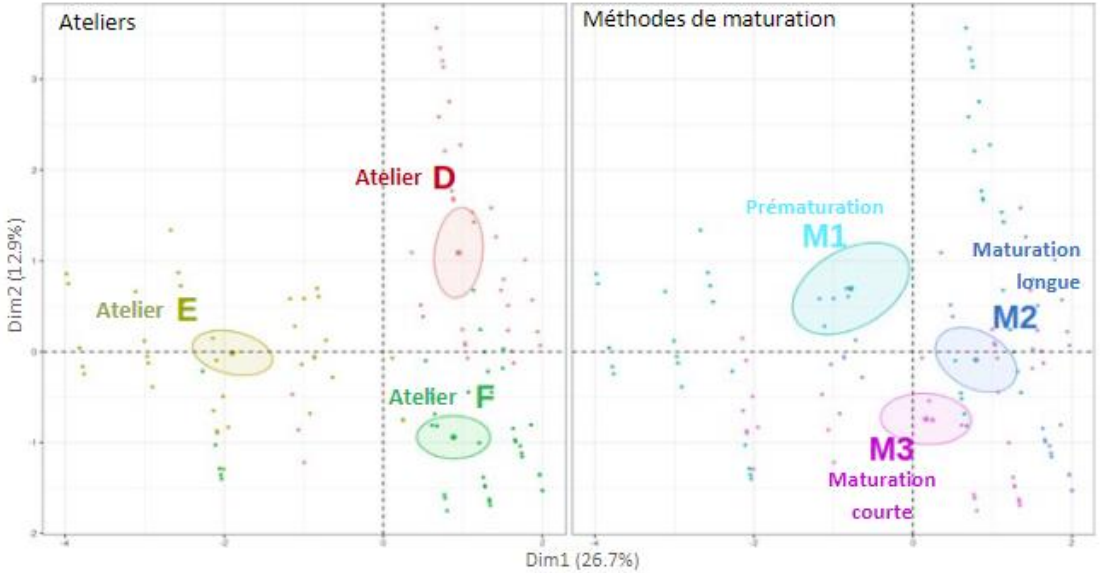
Pratiques d'ensemencement avec des **maturations** plus ou moins longues

Les ***Debaryomyces hansenii*** sont majoritaires dans les **croûtes** et les ***Mucor*** majoritaires dans les **pâtes**, ce qui est contraire aux *a priori*.

Abondances relatives des 30 espèces fongiques majoritaires



Les qualités organoleptiques des fromages dépendent de la méthode de maturation et de l'atelier dans laquelle elle est utilisée



Analyse factorielle multiple

en haut : ateliers et méthodes de maturation ;
en bas : qualités organoleptiques des pates en fin d'affinage (à 40 jours) et diversité bactérienne (Shannon) des pates (à 20 jours)

Merci de votre attention

Annexes

Quelle diversité des ensemencement indigènes ?

Quelles différences en termes de composition bactérienne selon les groupes de ferments ?

Mais les **équilibres** entre ces espèces ne sont pas les mêmes d'un groupe de ferment à un autre.

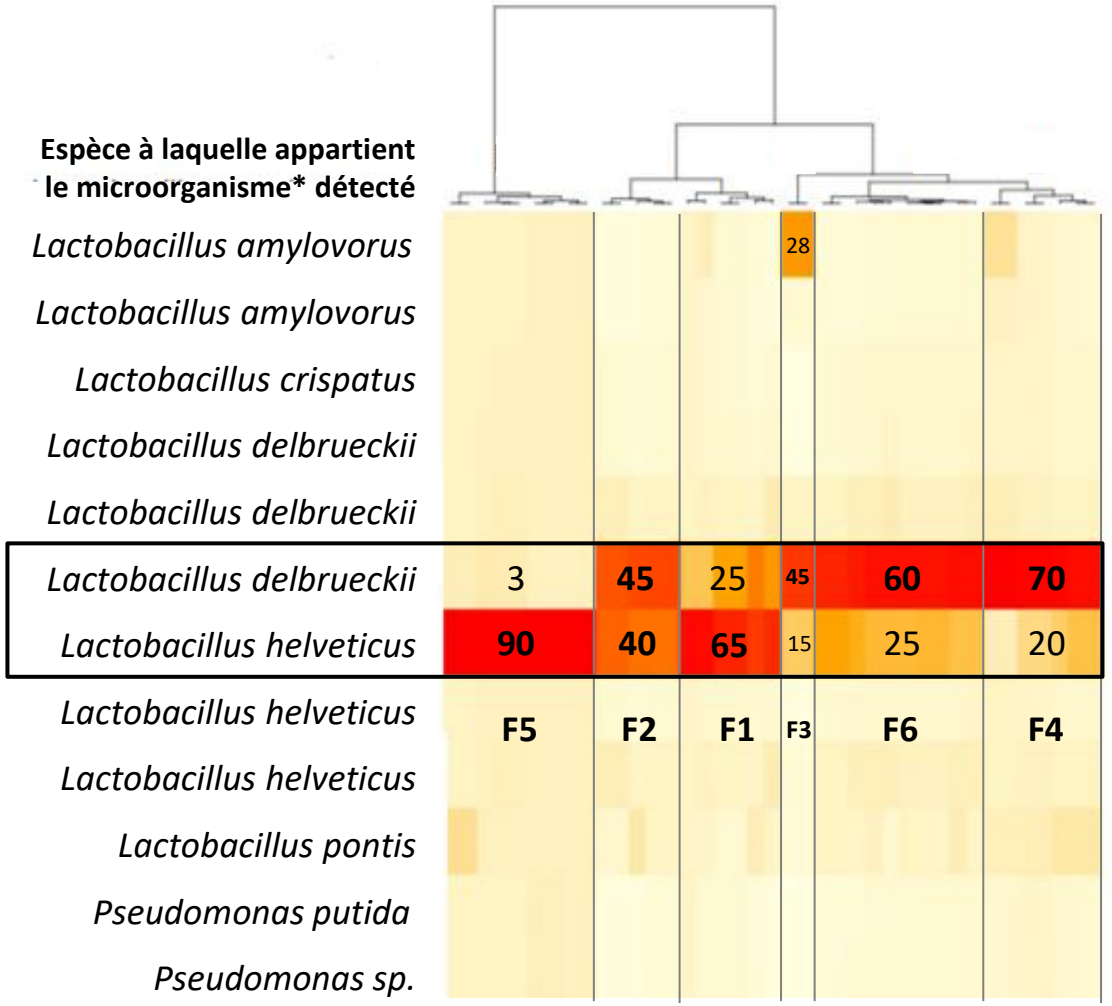
Les deux ferments du groupe F3, présentent la particularité que *Lactobacillus amylovorus* est plus abondant que *L. helveticus.*

Attention : plusieurs microorganismes peuvent appartenir à la même espèce mais avoir des prépondérances différentes dans les ferments.

Heatmap - Clustering par méthode Ward, sur matrice de distances de Bray Curtis (% d'abondance)

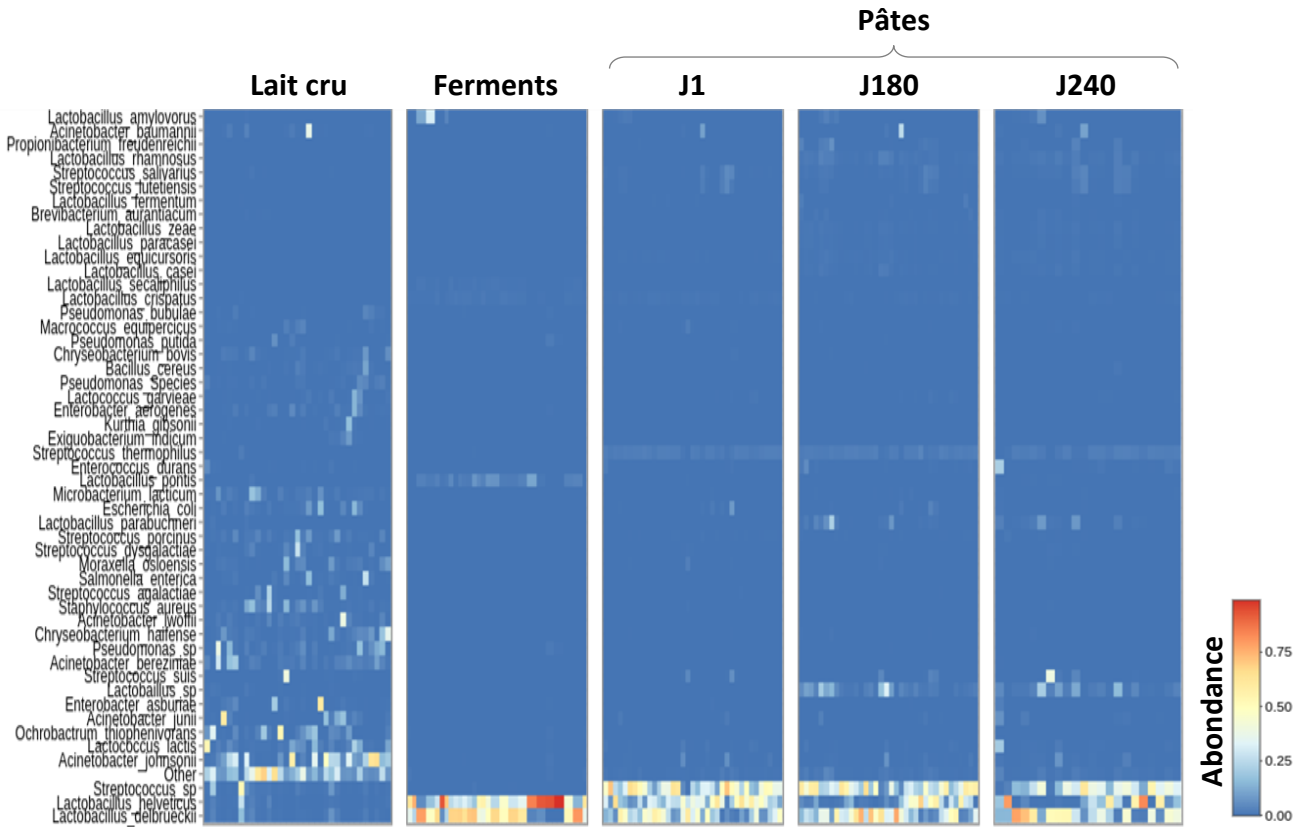
Abondances relatives des bactéries dans les ferments*

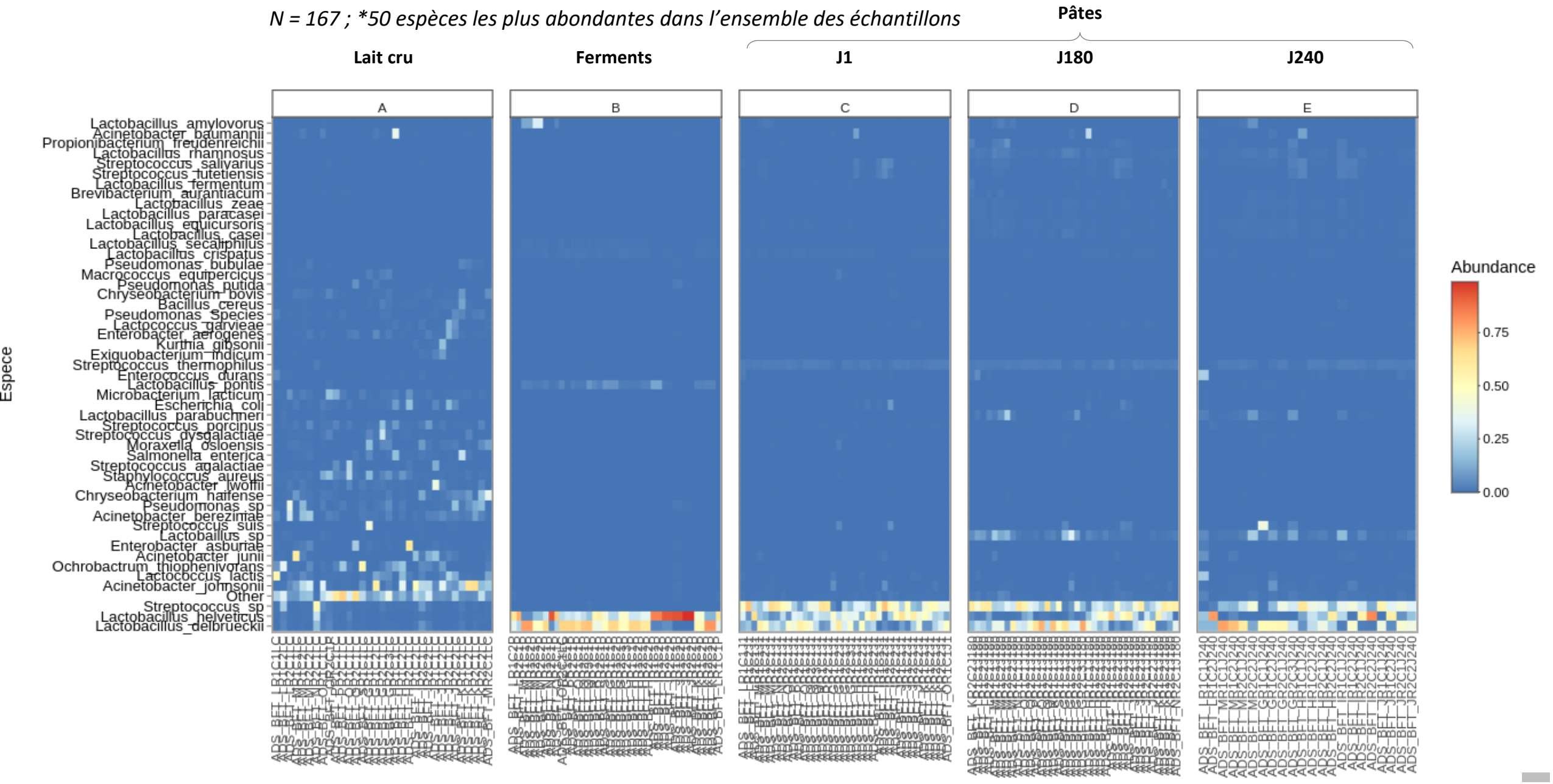
*N = 39 ; *OTU les plus abondantes dans l'ensemble des ferments*



Abondances relatives des bactéries dans les échantillons*

*N = 167 ; *50 espèces les plus abondantes dans l'ensemble des échantillons*



Abondances relatives des bactéries dans les échantillons*

*N = 167 ; *50 espèces les plus abondantes dans l'ensemble des échantillons*