
Étude de l'effet mécanique et thermique de la microfluidisation sur la charge microbienne du lait cru

Auteur : Brouet, Michaël

Promoteur(s) : Jacquet, Nicolas; Blecker, Christophe

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18315>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

ÉTUDE DE L'EFFET MÉCANIQUE ET THERMIQUE DE LA MICROFLUIDISATION SUR LA CHARGE MICROBIENNE DU LAIT CRU

MICHAEL BROUET

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022-2023

CO-PROMOTEURS: PROF. CHRISTOPHE BLECKER, DR NICOLAS JACQUET

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

ÉTUDE DE L'EFFET MÉCANIQUE ET THERMIQUE DE LA MICROFLUIDISATION SUR LA CHARGE MICROBIENNE DU LAIT CRU

MICHAEL BROUET

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022-2023

CO-PROMOTEURS: PROF. CHRISTOPHE BLECKER, DR NICOLAS JACQUET

Le présent travail de fin d'études a été mené au sein du laboratoire de science des aliments et formulation (TERRA – Gembloux Agro-Bio Tech).

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide d'une série de personnes que je tiens à remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Christophe Blecker et le Docteur Nicolas Jacquet, mes co-promoteurs, pour leurs précieux conseils et pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de science des aliments et formulation. Je tiens remercier plus particulièrement, le Dr Nicolas Jacquet pour l'accompagnement tout au long du travail.

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire de science des aliments et formulation, Alain, Haroun, Marjorie, Lynn et Sandrino pour leur accueil et leur disponibilité avec un remerciement particulier à Marjorie pour sa disponibilité permanente et sa gentillesse.

Merci au Prof. Frank Delvigne de m'avoir permis de réaliser les analyses microbiologiques dans son laboratoire. Merci également à son équipe pour leur accueil amical et leurs conseils.

Merci au Prof. Marianne Sindic de m'avoir donné accès à son laboratoire pour effectuer les analyses de la lactoperoxydase. Merci à Nelly Potvin pour l'aide durant ces analyses.

Merci à mes nombreuses activités extrascolaires et aux personnes qui les composent d'avoir pris mon temps pour garder mon moral au top et développer un tas de compétences transversales.

Pour finir, merci à la grande famille Gembloutoise sans qui mon cursus n'aurait pas eu la même saveur.

RÉSUMÉ

L'impact de la combinaison des effets mécanique (cisaillement) et thermique (échauffement) de la microfluidisation a été étudié sur la qualité microbiologique et enzymatique du lait cru de vache. Le lait cru a été mûri puis congelé afin d'avoir une charge microbienne élevée et une composition similaire durant l'ensemble des essais pilotes. De 1 à 5 passages à une pression de travail de 150 MPa ont été réalisés à l'aide d'un *Microfluidizer*®. Pour commencer, plusieurs passages sans refroidissement ont été réalisés pour étudier la combinaison des deux effets. Ensuite, l'effet mécanique a été déterminé en refroidissant directement le lait après chaque passage. Pour finir, des traitements thermiques équivalents à ceux subis lors de la microfluidisation ont été réalisés pour étudier l'effet thermique. Afin de consolider les observations, des essais avec du lait cru frais et du lait stérile ont également été réalisés. Lors des expérimentations, la flore mésophile, la flore psychrotrophe et les bactéries lactiques ont été dénombrées. La combinaison des effets mécanique et thermique a permis d'atteindre des niveaux de contaminations résiduels. Le nombre de passages et l'augmentation de la température d'entrée qui s'en suit ont augmenté la destruction des microorganismes. Ensuite, les activités de la phosphatase alcaline et de la lactoperoxydase ont été quantifiées. La phosphatase alcaline a été inactivée par les deux effets de la microfluidisation tandis que l'activité lactoperoxydase a été principalement réduite par l'effet mécanique. En définitive, des barèmes de pasteurisation peuvent être atteints après 3 passages à 150 MPa. De plus, le traitement par microfluidisation réduit l'impact du traitement thermique sur le lait.

Mots clés : microfluidisation, lait, qualité microbiologique, phosphatase alcaline, lactoperoxydase, traitement thermique

ABSTRACT

The impact of the combination of mechanical (shearing) and thermal (heating) effects of microfluidization was studied on the microbiological and enzymatic quality of raw bovine milk. The raw milk was matured and then frozen to have a high microbial load and similar composition throughout the pilot experiments. From 1 to 5 passes at a working pressure of 150 MPa were performed using a *Microfluidizer*®. First of all, several passes without cooling were conducted to study the combination of both effects. Then, the mechanical effect was determined by directly cooling the milk after each pass. After all, thermal treatments equivalent to those undergone during microfluidization were conducted to study the thermal effect. To reinforce the observations, tests with fresh raw milk and sterile milk were also carried out. During the experiments, mesophilic flora, psychrotrophic flora, and lactic acid bacteria were counted. The combination of mechanical and thermal effects led to achieving residual contamination levels. The number of passes and the subsequent increase in inlet temperature increased the destruction of microorganisms. Next, the activities of alkaline phosphatase and lactoperoxidase were quantified. Alkaline phosphatase was inactivated by both effects of microfluidization, while lactoperoxidase activity was mainly reduced by the mechanical effect. Ultimately, pasteurisation criteria could be achieved after 3 passes at 150 MPa. Furthermore, microfluidization treatment mitigated the impact of thermal treatment on the milk.

Keywords : microfluidization, milk, microbiology, alkaline phosphatase, lactoperoxydase, heat treatment

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	3
2. État de l'art	4
2.1. Le lait	4
2.1.1. Composition microbienne et qualité microbiologique.....	4
2.1.2. Composition enzymatique	5
2.1.2.1. Phosphatase alcaline.....	6
2.1.2.2. Lactoperoxydase.....	6
2.2. Procédés de conservation du lait	6
2.2.1. Traitement thermique	6
2.2.2. Traitements à hautes pressions	7
2.2.2.1. Technologies d'homogénéisation	7
2.2.2.2. Technologie de microfluidisation	7
2.2.2.3. Effets des traitements à haute pression.....	8
2.3. Congélation.....	11
2.3.1. Impact sur la qualité microbiologique	11
2.3.2. Impact sur les enzymes	11
3. Objectif.....	12
4. Matériel et méthode.....	13
4.1. Matière première.....	13
4.1.1. Origine	13
4.1.2. Maturation.....	13
4.1.3. Congélation	13
4.1.4. Décongélation	13
4.2. Microfluidisation	13
4.3. Traitement thermique.....	15
4.4. Analyses microbiologiques.....	16
4.5. Dosage des activités de la phosphatase alcaline et de la lactoperoxydase	17

5. Résultats et discussions	18
5.1. Évolution de la qualité microbiologique du lait cru lors de la maturation, congélation et décongélation.....	18
5.2. Impact de la microfluidisation sur la charge microbienne.....	20
5.2.1. Impact de la combinaison de l'effet mécanique et thermique	20
5.2.2. Impact du cisaillement sans échauffement.....	21
5.2.3. Impact de la microfluidisation sur la température du produit.....	22
5.2.4. Impact de l'application d'un traitement thermique équivalent à celui généré lors de la microfluidisation	24
5.2.5. Évaluation de la contamination endogène au protocole.....	25
5.2.6. Impact du temps de repos à la sortie du traitement de microfluidisation	26
5.2.7. Validation des résultats sur un lait cru frais	27
5.2.8. Conclusion de l'impact sur la charge microbienne.....	29
5.3. Impact de la microfluidisation sur la présence enzymatique.....	30
5.3.1. Impact sur l'activité de la phosphatase alcaline.....	30
5.3.1.1. Impact de la microfluidisation sur l'activité phosphatase alcaline.....	30
5.3.1.2. Impact d'un traitement thermique correspondant sur l'activité de la phosphatase alcaline	31
5.3.2. Impact sur l'activité de la lactoperoxydase.....	32
5.3.2.1. Impact de la microfluidisation sur l'activité de la lactoperoxydase.....	32
5.3.2.2. Impact d'un traitement thermique correspondant sur l'activité de la lactoperoxydase.....	33
6. Contribution personnelle de l'étudiant.....	35
7. Conclusion et perspectives	36
8. Bibliographie.....	38
9. Liste des figures	44
10. Liste des tableaux	44

1. INTRODUCTION

Le lait est une source nutritionnelle riche utilisée par des millions de personnes à travers le monde. En 2022, la production mondiale de lait s'élève à 897 Mt soit une consommation annuelle de 15,7 kg par habitant (en équivalent extrait sec, teneur en eau exclue). Durant les prochaines années, la production devrait augmenter suite à l'augmentation des revenus de la population des pays en développement comme l'Inde ou le Pakistan. Malgré une stabilisation de sa production, l'Union européenne reste le deuxième producteur mondial. (OCDE/FAO, 2023)

La composition nutritionnelle riche du lait et son activité de l'eau élevée permettent le développement de microorganismes (Fox et al., 2015). Les principales sources de microorganismes sont les mamelles et la surface des trayons. Ensuite, les procédés de récolte et de conservation du lait cru sont des sources importantes de contamination (Parente et al., 2020). Si la plupart des microorganismes présents dans le lait sont sans danger pour l'homme, la présence occasionnelle d'agents pathogènes représente un risque élevé pour la santé. (Claeys et al., 2013; Verraes et al., 2015)

Afin de réduire le risque d'infections et d'épidémies causées par la consommation du lait cru, le traitement thermique du lait s'est imposé au 20^e siècle (Claeys et al., 2013). Grâce à la pasteurisation, le lait peut être conservé au frais pendant plusieurs jours, tandis que la stérilisation permet de conserver le lait pendant une longue période à température ambiante (Fox et al., 2015). Cependant, l'échauffement du lait entraîne des changements nutritionnels, organoleptiques et technologiques. (Jo et al., 2018; Pereda et al., 2009)

Pour limiter les dégradations du traitement thermique sur le lait, la température et la durée de ce traitement doivent être réduites. Pour atteindre les barèmes de pasteurisation sans avoir recours à un traitement thermique, les traitements à hautes pressions sont des alternatives prometteuses déjà étudiées (Mercan et al., 2018; Pereda et al., 2007; Ruiz-Espinosa et al., 2013). Une chute de pression brusque induit un effet cisaillement qui permet de détruire les microorganismes (Hayes et al., 2005). Cependant, les pressions nécessaires à une bonne efficacité sont actuellement difficiles à atteindre industriellement. (Dumay et al., 2013)

Dans ce travail, un traitement à haute pression spécifique, la microfluidisation, est utilisé. Cette technologie, légèrement différente de l'homogénéisation à haute pression, permet d'atteindre de meilleurs résultats à des pressions inférieures. (Ciron et al., 2012; Schultz et al., 2004) De plus, l'effet thermique du procédé est également pris en compte afin d'améliorer la destruction des microorganismes. Enfin, l'efficacité après plusieurs passages est étudiée.

En définitive, la combinaison de l'effet mécanique et de l'effet thermique de la microfluidisation sur la charge microbienne du lait est étudiée dans ce travail. L'objectif est d'atteindre les barèmes de pasteurisation en limitant les dégradations dues à un traitement thermique.

2. ÉTAT DE L'ART

2.1. Le lait

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré. Il est sécrété par les glandes mammaires des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes. Le lait de vache est constitué en moyenne de 3,7 % de lipides, de 3,4 % de protéines et 88 % d'eau (Fox et al., 2015). Son pH est situé proche du pH neutre (Fox et al., 2015; Quigley, O'Sullivan, et al., 2013). Le lait est également une source riche en vitamines comme la riboflavine ou la vitamine B12 (Claeys et al., 2013; Singhal et al., 2017). Sa composition et son activité d'eau élevée font du lait un milieu propice au développement de microorganismes (Fox et al., 2015).

2.1.1. Composition microbienne et qualité microbiologique

La récolte du lait induit une charge microbienne intrinsèque provenant du trayon de l'animal et des installations en contact avec le produit (Parente et al., 2020). Pour garantir la qualité microbiologique, les producteurs sont tenus de respecter une charge microbienne maximale. Le règlement 853/2004 du parlement et du conseil européen fixe notamment deux critères, le lait doit contenir moins de 100 000 germes/ml et moins de 400 000 ufc/ml de cellules somatiques (Régulation Européenne (CE) N° 853/2004). Selon le comité du lait, 94,9 % des échantillons prélevés à la ferme en Wallonie en 2022 respectent la limite des germes totaux avec une moyenne géométrique de 15 600 germes/ml. Pour les cellules somatiques, 92,7 % des échantillons sont inférieur à 400 000 cellules/ml avec une moyenne géométrique de 204 000 cellules/ml (Comité du lait (CDL), 2023).

Le lait cru contient une grande diversité de microorganisme. En effet, la flore microbienne du lait cru est constituée en moyenne de 55 % de bactéries Gram -, 41 % de bactéries Gram + et 4 % de levures (Fricker et al., 2011; von Neubeck et al., 2015). En outre, une grande variabilité entre les échantillons est présente. En général, les échantillons sont dominés soit par des bactéries Gram -, soit par des bactéries lactiques (Gram +). Une vingtaine d'espèces de bactéries différentes sont présentes en moyenne dans les échantillons. Les genres *Pseudomonas*, *Lactococcus* et *Acinetobacter* sont les plus représentés (von Neubeck et al., 2015).

Deux flores se retrouvent principalement dans le lait.

Premièrement, la flore mésophile représente l'ensemble des bactéries qui ont une croissance optimale à une température de 30 à 37 °C (Johnson, 2013). Elle est composée d'une multitude de genres comprenant principalement les bactéries lactiques, mais aussi les genres *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, ce qui en fait un bon indicateur de la qualité du lait (Quigley, O'Sullivan, et al., 2013).

Deuxièmement, la flore psychrotrophe contient des microorganismes capables de se développer à basse température (en dessous de 10 °C), mais qui ont un optimum de développement entre 15 et 20 °C (de Oliveira et al., 2015). Dans le lait, la majorité des bactéries psychrotrophe sont des *Pseudomonas* suivis des entérobactéries et de bactéries Gram positives (de Oliveira et al., 2015; Ercolini et al., 2009; Quigley, O'Sullivan, et al., 2013). Le développement de la conservation du lait cru à basse température augmente la présence de flore psychrotrophe, en

particulier le genre *Pseudomonas* (Quigley, McCarthy, et al., 2013; von Neubeck et al., 2015). Ces bactéries psychrotrophes sont aujourd'hui principalement responsables de la détérioration du lait (Johnson, 2013).

Malgré les températures de croissance différentes, certains microorganismes sont capables de se développer dans les deux flores (Ercolini et al., 2009; Johnson, 2013).

Contrairement aux groupements par température de croissance optimale, les bactéries lactiques sont des bactéries Gram positive qui fermentent les sucres en acide lactique. En effet, les bactéries lactiques permettent l'acidification du lait, une caractéristique qui s'avère bénéfique dans la production de denrées transformées telles que le fromage et le yaourt (Wang et al., 2021). Six genres principaux de bactéries ont été identifiés dans le lait : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Streptococcus* (Franciosi et al., 2009).

Le lait cru peut également contenir des microorganismes pathogènes. Plusieurs causes peuvent en être à l'origine. Premièrement, une infection systémique de l'animal peut engendrer une contamination endogénique du lait par le sang. Deuxièmement, une contamination exogène pendant ou après la traite est possible. Les principaux organismes pathogènes retrouvés dans le lait sont *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* producteur de vérotoxines (VTEC), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Campylobacter* (Claeys et al., 2013; Verraes et al., 2015). Cependant, *L. monocytogenes* et *S. aureus* sont peu susceptible de provoquer une infection humaine dans le lait cru grâce à la compétition avec la flore naturelle du lait (Claeys et al., 2013).

2.1.2. Composition enzymatique

Le lait contient une septantaine d'enzymes endogènes, provenant de trois sources principales. La première source est la membrane des globules gras composée de la membrane des cellules mammaires. Ensuite, du cytoplasme contenant des enzymes peut se retrouver dans le lait suite à l'excrétion des globules gras par les cellules mammaires. Pour finir, les enzymes peuvent provenir de fuites du sang de l'animal dans le lait. Ces enzymes remplissent plusieurs rôles technologiques significatifs dans le lait. Certaines comme la sulphydryl oxydase favorisent la conservation du lait. D'autres ont des propriétés antimicrobiennes comme la lactoperoxydase (Fox et al., 2015). Par contre, plusieurs enzymes participent activement à la détérioration du lait comme les lipases et les protéinases (Chen et al., 2003).

Le dosage des activités enzymatiques est régulièrement utilisé pour déterminer la qualité du lait. La phosphatase alcaline et la lactoperoxydase sont deux enzymes utilisées en contrôle de routine de la qualité du traitement thermique (EFSA et al., 2021). La présence d'activité élevée d'autres enzymes peut révéler la présence de maladie chez l'animal comme augmentation de l'activité de la catalase lors de mastite (Fox & Kelly, 2006).

2.1.2.1. *Phosphatase alcaline*

La phosphatase alcaline est une enzyme hydrosoluble associée à la membrane des globules gras du lait. Largement répandu chez les êtres vivants, ce phospho-monoestérase catalyse un monoester de phosphate, produisant un groupement phosphate et un alcool (Rankin et al., 2010). La concentration de la phosphatase alcaline dans le lait de vache est de 1870 à 4740 µg phénol/ml (Klotz et al., 2008). Du point de vue de la qualité microbiologique du lait, cette enzyme est un indicateur du respect des barèmes de pasteurisation (Klotz et al., 2008; Lorenzen et al., 2011). En effet, cette enzyme est légèrement plus résistante à un traitement thermique que le microorganisme de référence, *Mycobacterium tuberculosis* (Fox et al., 2015). Dans ce cadre, la Commission européenne a défini qu'un lait de vache dont l'activité de l'enzyme est inférieure à 350 mU/l a subi une pasteurisation acceptable (Règlement (CE) N° 1664/2006 de la Commission Européenne).

2.1.2.2. *Lactoperoxydase*

La lactoperoxydase est la seconde enzyme endogène la plus présente dans le lait. Sa présence permet de protéger le nouveau-né des microorganismes pathogènes. En effet, la lactoperoxydase catalyse la réaction entre le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène, dont les produits de réaction donnent des agents antimicrobiens. (Kussendrager & Hooijdonk, 2000; Seifu et al., 2005) La lactoperoxydase est une enzyme résistante au traitement thermique et plus particulièrement dans le lait de vache. Des températures supérieures à 78 °C pendant 15 secondes sont nécessaires pour l'inactiver. (Dumitraşcu et al., 2012; Lorenzen et al., 2010) Par conséquent, cette enzyme permet différencier les traitements de pasteurisation et stérilisation puisque son activité sera conservée après un traitement de pasteurisation. (Lorenzen et al., 2011)

2.2. Procédés de conservation du lait

2.2.1. Traitement thermique

Afin de réduire le risque d'infections lié à la consommation de lait cru, l'application d'un traitement thermique est devenue la norme à partir du 20e siècle (Claeys et al., 2013). Les barèmes temps/températures actuellement admis pour la pasteurisation du lait sont de 63 °C pendant 30 min (basse température, longue durée) ou de 72 °C pendant 15 s (haute température, temps court) afin d'obtenir une réduction décimale de minimum 5 log₁₀ (Codex Alimentarius, 2009; Van Brandt et al., 2011). Les microorganismes de référence pour la pasteurisation sont *M. paratuberculosis* et plus récemment *Coxiella burnetii* (Claeys et al., 2013; Codex Alimentarius, 2009). Du point de vue de la qualité générale du lait, les traitements thermiques impactent faiblement les valeurs nutritionnelles par rapport aux recommandations journalières (Claeys et al., 2013). Par contre, un traitement thermique implique la formation de réaction de Maillard et une dénaturation des protéines qui affecte les propriétés organoleptiques du produit (Jo et al., 2018; Pereda et al., 2009).

2.2.2. Traitements à hautes pressions

2.2.2.1. Technologies d'homogénéisation

L'homogénéisation est utilisée dans plusieurs secteurs comme l'industrie agroalimentaire, cosmétique ou pharmaceutique. Au cours du procédé, le produit est contraint de traverser une ouverture étroite (Gap), illustrée dans la Figure 1. Pour faciliter le passage du liquide, des pistons exercent une force sur le liquide, ce qui provoque une augmentation de la pression en amont de l'ouverture. Ensuite, la vitesse du liquide augmente fortement lors du passage de l'ouverture entraînant un effet cisaillement. La pression de travail est ajustée en régulant la distance entre l'aiguille (Needle) et le siège (Seat) visible sur la Figure 1 (Patrignani & Lanciotti, 2016). Dans le secteur laitier, les procédés d'homogénéisation permettent de réduire la taille des globules gras afin de stabiliser l'émulsion et d'éviter une remontée de crème durant la conservation du lait (Hayes et al., 2005; Patrignani & Lanciotti, 2016). Pour finir, les technologies actuelles, permettant d'atteindre 400 MPa, augmentent les forces de cisaillement et permettent la destruction de microorganismes (Dumay et al., 2013; Pereda et al., 2007).

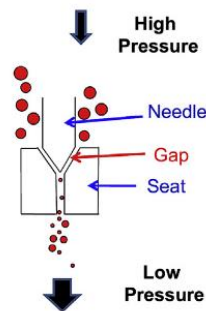


Figure 1 : Représentation schématique d'une valve de haute pression en Y (Dumay et al., 2013)

2.2.2.2. Technologie de microfluidisation

La microfluidisation est un procédé continu dans lequel un fluide passe par une chambre d'interaction à géométrie fixe. Composée de microcanaux de diamètre inférieur à 500 μm , la chambre permet une montée en pression du liquide de 50 MPa à 200 MPa. Contrairement à l'homogénéisation, la pression d'opération est constante et régulée par la vitesse du piston (Kumar et al., 2022; Microfluidics, 2014). La pression à l'entrée de la chambre d'interaction entraîne deux mécanismes principaux. D'une part, la vitesse du fluide, qui peut atteindre 400 m/s dans le microcanal, crée une force de cisaillement entre le fluide et les parois. D'autre part, le fluide à haute vitesse provoque des forces de collisions des particules entre elle et les parois (Kumar et al., 2022; Mert, 2020). Ces forces permettent de réduire la taille des globules dans une émulsion et de les stabiliser sur le long terme. De plus, d'autres applications sont possibles comme la dénaturation de protéine, l'amélioration de propriété rhéologique ou l'inactivation d'enzymes et microorganismes. (Bucci et al., 2018; Ciron et al., 2012; Kumar et al., 2022; Mert, 2020)

Deux types de chambres d'interactions sont disponibles. Premièrement, dans la géométrie en « Y », le flux est séparé dans deux microcanaux. Ensuite, les deux flux se rencontrent dans une chambre de collisions. Ce type est principalement utilisé pour la formation d'émulsion et de liposomes (huile dans eau) ou d'encapsulation de polymères (Kumar et al., 2022; Microfluidics, 2014). Deuxièmement, la géométrie en « Z » est en forme de zigzag (Figure 2). Le changement de direction du fluide entraîne des collisions particules-particules et particules-parois augmentant la destruction des globules ou des cellules. Les chambres de forme « Z » sont utilisées pour la destruction de cellules ou la dispersion et la séparation de solides. Cette configuration est également utile pour des émulsions eau dans huile (Mert, 2020; Microfluidics, 2014).

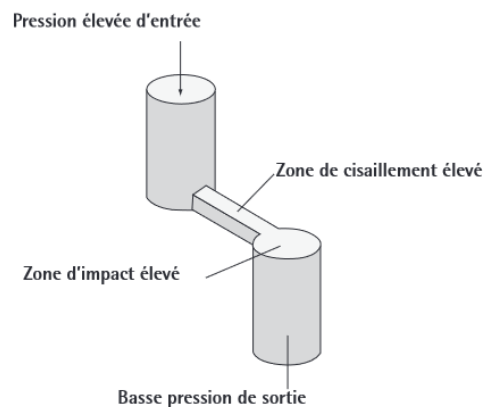


Figure 2 : Chambre d'impact en « Z » (Microfluidics, 2010)

L'utilisation de la microfluidisation par rapport à l'homogénéisation à haute pression présente plusieurs avantages. Pour commencer, les tailles de particules obtenues sont plus fines. Le cisaillement uniforme dû à la pression de travail constante résulte en une distribution fine de la taille des particules. (Kumar et al., 2022; Perrier-Cornet et al., 2005; Schultz et al., 2004). Ensuite, la géométrie des chambres entraîne un cisaillement plus important. En effet, les forces de cisaillement de l'homogénéisation à haute pression sont inférieures. Par conséquent, les techniques classiques requièrent des pressions supérieures pour atteindre la même efficacité que la microfluidisation. (Ciron et al., 2012; Schultz et al., 2004) Cependant, les chambres d'interactions sont susceptibles de s'encrasser plus rapidement. (Kumar et al., 2022)

2.2.2.3. Effets des traitements à haute pression

Pour commencer, les traitements à haute pression provoquent un effet mécanique de cisaillement par deux phénomènes. D'une part, la vitesse importante à l'entrée de la valve ou du micro canal entraîne un stress d'élongation entre le fluide et les parois. D'autre part, un phénomène de cavitation est présent. En effet, la chute brusque de pression à la sortie de la valve ou du micro canal forment des bulles de gaz qui implosent. La différence de pression et les turbulences augmentent le phénomène de cavitation (Floury et al., 2004; Picart et al., 2006). Ensuite, la conversion adiabatique de l'énergie cinétique en chaleur à la sortie de la valve et la friction de l'effet mécanique entraînent un effet thermique (Dumay et al., 2013; Hayes & Kelly, 2003; Thiebaud et al., 2003).

2.2.2.3.1. Effets des traitements à haute pression sur la qualité microbiologique

Homogénéisation à haute pression

L'homogénéisation à haute pression impacte principalement la membrane des microorganismes grâce à l'effet mécanique. En effet, les bactéries Gram+ qui disposent d'une membrane plus épaisse sont plus résistantes que les bactéries Gram- ou les levures (Donsi et al., 2009). De plus, l'observation au microscope électronique des parois d'*E. Coli* et *S. aureus* permet d'apercevoir une augmentation de la rugosité des membranes après le traitement (Dong et al., 2021). Cependant, le traitement n'entraîne pas une diminution de l'espérance de vie sur les cellules survivantes (Donsi et al., 2009).

Plusieurs paramètres de l'HPP influencent l'efficacité de la réduction microbienne, la pression, la température d'entrée et le nombre de passages. Premièrement, la diminution de la charge microbienne est proportionnelle à l'augmentation de la pression jusqu'à 200 MPa (Dong et al., 2021; Donsi et al., 2009; Dumay et al., 2013). Au-delà de 200 MPa, aucune différence significative sur les microorganismes les plus sensibles comme *E. coli* n'existe (Donsi et al., 2009; Pereda et al., 2007). Deuxièmement, la température d'entrée a un effet limité sur la diminution de la charge microbienne totale (Donsi et al., 2009). Troisièmement, la multiplication des passages contribue à une meilleure réduction de la charge microbienne. Cependant, la linéarité de la mortalité en fonction du nombre de passages n'est pas établie (Donsi et al., 2009; Dumay et al., 2013; Ruiz-Espinosa et al., 2013).

L'efficacité de ces trois facteurs est liée à la biodiversité microbienne de l'échantillon (Donsi et al., 2009; Mercan et al., 2018; Picart et al., 2006). Picart et al. a démontré que la pression et le nombre de passages augmentent la létalité du traitement de manière différente pour des bactéries Gram+ (*L. innocua* et *Micrococcus luteus*) et une bactérie Gram- (*P. fluorescens*) (Picart et al., 2006). De plus, la flore psychrotrophe est plus sensible au traitement d'homogénéisation (Pereda et al., 2007). Pour finir, l'augmentation de la température d'entrée entraîne une forte augmentation de la létalité sur certaines souches comme *L. delbrueckii* (Gram+) (Donsi et al., 2009).

Microfluidisation

Le traitement par microfluidisation permet de réduire la charge microbienne de différents milieux comme le lait ou les jus de fruits (Bucci et al., 2018; Koley et al., 2020). L'efficacité de la destruction des organismes vivants dépend de plusieurs paramètres similaires à l'homogénéisation à haute pression.

Pour commencer, l'augmentation de la pression de travail améliore fortement la destruction des microorganismes (Bucci et al., 2018; Kohli et al., 2019; S. V. Singh et al., 2022). Par exemple, la flore totale d'un jus de carotte est respectivement réduite de 0,7, 2,1 et 3,9 après un passage à 34, 69 et 103 MPa (Koley et al., 2020).

Ensuite, le nombre de passages augmente l'efficacité du traitement. Cependant, les réductions observées ne sont pas toutes proportionnelles aux nombres de passages (Kohli et al., 2019; Koley et al., 2020; M. Liu et al., 2021; Tarafdar et al., 2021). Shingh et al. a observé une augmentation de la réduction de la flore totale dans un jus de sapotille en fonction du nombre

de passages. Pour 1, 2 et 3 passages à 138 MPa, les réductions observées sont de 0,19, 1,94 et 2,46 log₁₀ ufc/ml (S. V. Singh et al., 2022).

Par la suite, une température d'entrée plus élevée permet une meilleure destruction des cellules. Une réduction de la mésophile dans du lait à 42 °C et 54 °C est respectivement de 1,3 et 2,5 log₁₀ ufc/ml avec 1 passage à 125 MPa (Bucci et al., 2018). Après 1 passage à 150 MPa, la réduction des spores de *Bacillus licheniformis* est de 0,2 log₁₀ ufc/ml avec une température d'entrée de 33 °C contre 0,4 à 50 °C (Feijoo et al., 1997).

De plus, la biodiversité du milieu influence l'efficacité du traitement. En effet, les bactéries lactiques et les levures sont plus sensibles à la microfluidisation (Koley et al., 2020). La flore psychrotrophe du lait cru est plus rapidement réduite que la flore mésophile (Bucci et al., 2018). Après 4 passages à 160 MPa, *E. Coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus plantarum* sont respectivement réduit de 6,96, 5,5 et 4,1 log₁₀ ufc/ml (M. Liu et al., 2021).

Pour finir, la géométrie de la chambre d'interaction influence la destruction des cellules. Une chambre de type « Z » est conseillée par le fabricant pour la désintégration cellulaire (Microfluidics, 2010). Dans la littérature, Koley et al. obtient de meilleures réductions avec une chambre de type « Z » que Tarafdar et al. et Singh et al. avec des chambres de type « Y ». Cependant, les jus de fruits utilisés sont différents (Koley et al., 2020; S. V. Singh et al., 2022; Tarafdar et al., 2021).

2.2.2.3.2. Effets des traitements à haute pression sur la température

L'homogénéisation à haute pression entraîne une augmentation de la température du lait de 15 à 19 °C par 100 MPa à la sortie de la valve de haute pression (Pereda et al., 2007; Picart et al., 2006). La microfluidisation entraîne également une hausse température de 17 à 21 °C dans différents milieux (eau, crème glacée et lait) (Bucci et al., 2018; Feijoo et al., 1997; Microfluidics, 2014). Avec une pression de 125 MPa, la température du lait entre l'entrée et la sortie du *Microfluidizer*® a augmenté de 23,5 °C (Bucci et al., 2018). La mise sous pression entraîne également une augmentation de la température, mais seulement de l'ordre de 2 à 3 °C (Dumay et al., 2013).

2.2.2.3.3. Effets des traitements à haute pression sur les enzymes

Phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline est réduite lors de traitements d'homogénéisation à hautes pressions supérieurs à 200 MPa grâce à l'effet de cisaillement (Picart et al., 2006). En dessous de 200 MPa, l'enzyme est principalement désactivée suite à l'effet thermique du traitement d'homogénéisation (Datta et al., 2005). Lors de traitements de microfluidisation, Bucci et al. a observé une diminution de l'activité de l'enzyme à des niveaux résiduels avec une pression minimum de 125 MPa et une température d'entrée de 42 °C. Cependant, vu la température de sortie de 65,5 °C, une partie de l'inactivation est due à l'effet thermique (Bucci et al., 2018).

Lactoperoxydase

L'activité résiduelle de la lactoperoxydase est inférieure à 1 % suite à un traitement d'homogénéisation à haute pression de 200 MPa avec refroidissement immédiat et une température d'entrée de 40 °C (Hayes et al., 2005; Pereda et al., 2007). Datta et al. a observé une diminution non linéaire de l'activité à 200 MPa en fonction de la température de sortie. Par conséquent, l'effet de cisaillement est partiellement responsable de l'inactivation de l'enzyme (Datta et al., 2005). En outre, aucune donnée sur l'effet de la microfluidisation sur l'activité de la lactoperoxydase n'est actuellement disponible.

2.3. Congélation

2.3.1. Impact sur la qualité microbiologique

La congélation impacte les microorganismes du lait. En effet, la congélation de l'eau extracellulaire forme des cristaux de glaces et augmente le gradient osmotique. Ces changements engendrent des lésions dans les membranes des cellules et le rétrécissement de celles-ci. En outre, une congélation rapide s'impose afin de minimiser la durée pendant laquelle le produit est exposé à des températures positives, ce qui limite la prolifération des microorganismes (Tribst et al., 2019).

L'impact de la congélation sur charge microbiologique du lait diffère entre les études. Selon Hubáčková et al. et de Garnica et al. aucune différence significative de la flore totale mésophile n'est observée après la congélation (de Garnica et al., 2011; Hubáčková & Ryšánek, 2007). D'autres montrent une diminution significative de la flore totale après plusieurs semaines de stockages (Biondi et al., 2021; Wendorff, 2001). Concernant la flore psychrotrophe et les bactéries lactiques, aucun impact n'a été observé par Biondi et al. (Biondi et al., 2021). De plus, la destruction des microorganismes dépend des microorganismes présents dans le milieu et la durée de stockage. Par exemple, *E. Coli* est plus fortement impacté par un stockage de longue durée à -20 °C que d'autres organismes comme *S. aureus* (Biondi et al., 2021; de Garnica et al., 2011).

Pour finir, l'impact de la congélation est difficile à quantifier en raison des conditions de décongélation qui influence la charge microbienne. La température de décongélation et le volume congelé impactent la vitesse de fonte de la glace et la qualité microbiologique du lait (Tribst et al., 2019).

2.3.2. Impact sur les enzymes

La congélation permet de conserver les enzymes du lait comme la lipase, le lysozyme ou la protéase. Les températures négatives et la présence de glace ne changent pas la conformation de la phosphatase alcaline (Champion et al., 2000). Par conséquent, son activité n'est pas impactée après la congélation. Par contre, une diminution significative de la lactoperoxydase a été observée après 3 mois de congélation à -25 °C (Friend et al., 1983).

3. OBJECTIF

Le premier objectif de ce travail vise à étudier l'impact de la combinaison des effets mécaniques (cisaillement) et thermiques (échauffement) de la microfluidisation sur la charge microbienne et l'activité enzymatique du lait cru.

En parallèle, un traitement thermique correspondant à celui généré par la microfluidisation a été appliqué sur un lait cru afin d'évaluer l'effet thermique. Pour rendre compte de l'apport de la composante mécanique du procédé (cisaillement et cavitation), un essai avec un refroidissement direct du lait a été réalisé.

Afin d'évaluer correctement les différents impacts du traitement, plusieurs analyses ont été réalisées. Tout d'abord, l'évolution de la charge microbienne du lait cru a été évaluée avec le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile et psychrotrophe. Le dénombrement des bactéries lactiques a également été réalisé.

Dans un deuxième temps, l'impact des traitements sur les activités enzymatiques de la phosphatase alcaline et de la lactoperoxydase a été étudié.

Enfin, le travail a aussi pour objectif d'atteindre une réduction microbienne suffisante pour garantir une pasteurisation tout en diminuant l'impact de l'échauffement thermique sur les propriétés du lait.

4. MATÉRIEL ET MÉTHODE

4.1. Matière première

4.1.1. Origine

Le lait cru de vache laitière Holstein, utilisé durant cette étude, provient de la ferme expérimentale du Centre Wallon de Recherches Agronomiques (Gembloux – Belgique). Le lait, provenant de la traite du jour (27/02/2023), est récupéré à une température de 9 °C. Les 250 litres issus de cet échantillonnage ont été conditionnés dans des bidons de 10 L afin d'être maturés et congelés. Un second échantillonnage (10 L - 23/06/2023) a également été collecté afin de réaliser l'essai avec du lait frais (P17).

4.1.2. Maturation

Avant congélation, le lait cru a été maturé à une température moyenne de 14,5 °C pendant 26 heures afin d'augmenter sa charge microbienne. Cette étape était nécessaire pour une meilleure évaluation de la réduction microbienne.

4.1.3. Congélation

Le lait maturé a été directement congelé dans une chambre froide à -18 °C. Les bidons ont été disposés au sol avec 15 cm d'espace entre eux afin de s'assurer que la cinétique de congélation est bien identique pour l'ensemble des échantillons. Le lait a atteint la température de 0 °C après 4 heures au congélateur. Un total de 48 h a été nécessaire pour atteindre une solidification complète et une température de -16 °C.

4.1.4. Décongélation

Lors de chaque essai, un bidon de 10 L est sorti du congélateur et est placé, au même endroit, dans une chambre tempérée à 15 °C. Après 70 heures de décongélation, le lait est alors prêt à être utilisé.

4.2. Microfluidisation

La microfluidisation est réalisée à l'aide d'un *Microfluidizer® M-110EH* (Microfluidics – Newton, Massachusetts, USA). Après mise sous pression, le lait passe par deux chambres de traitement de type « Z » (Figure 2). La première chambre (H30Z 200µ ceramic), qui permet de casser les agrégats importants, est constituée d'un micro canal de 200 µm de diamètre. La seconde chambre (H10Z 100µ ceramic), qui est dédiée à l'application du traitement, dispose d'un micro canal de 100 µm de diamètre. Le traitement est ensuite appliqué à une pression de 150 MPa avec un nombre variable de passages.

Une fois le traitement appliqué, les échantillons sont prélevés dans un récipient en verre de 100 ml (Schott Duran) préalablement stérilisé puis plongés dans un bain de glace à 0 °C. Si un temps de repos est défini, le récipient fermé est laissé à la température de sortie du *Microfluidizer®* avant d'être plongé dans le mélange eau-glace.

En parallèle, un échantillon témoin de lait, qui n'a pas subi de prétraitement est plongé également dans la glace en début de la manipulation. Le suivi des températures des échantillons à l'aide d'un enregistreur de température (YC-747UD, YCT)

Une fois l'essai réalisé, le *Microfluidizer*® est rincé à l'eau distillée. Une solution de nettoyage (Dilution à 2 % de Process2Clean 3 hydroxyacetic acid cleaner – Veltek Associates Inc.) est ensuite appliquée en circuit fermé pendant 15 minutes à pression minimale pour stériliser l'équipement. Le système est à nouveau rincé à l'eau distillée après stérilisation.

L'ensemble des essais pilotes réalisés avec le *Microfluidizer*® est repris dans le Tableau 1

Tableau 1 : Liste des essais pilotes de microfluidisation

Numéro	Type	Conditions	Date
P01	Microfluidisation (Essai préliminaire)	150 MPa – 3 minutes de repos	28/02/2023
P02	Microfluidisation	150 MPa – 3 minutes de repos	13/03/2023
P03	Microfluidisation	150 MPa – 5 minutes de repos	17/03/2023
P06	Microfluidisation	150 MPa – pas de repos	31/03/2023
P08	Microfluidisation	150 MPa – 3 minutes de repos	21/04/2023
P09	Microfluidisation	145 MPa – pas de repos	05/05/2023
P10	Microfluidisation	145 MPa – 3 minutes de repos	08/05/2023
P11	Microfluidisation	145 MPa – 5 minutes de repos	12/05/2023
P16	Microfluidisation (avec refroidissement)	140 MPa – pas de repos – refroidissement immédiat	19/06/2023
P17	Microfluidisation (Lait frais non mûré)	Lait frais – 150 MPa pas de repos	23/06/2023
P18	Microfluidisation (Étude contamination)	Lait UHT – 150 MPa pas de repos	26/06/2023

4.3. Traitement thermique

Les traitements thermiques ont été réalisés à l'aide de tube tubulaire en inox de 0,5 cm de diamètre et de 1 m de longueur. Ces tubes sont plongés dans un bain-marie (Lauda PROLINE P26) réglé à la température désirée. La température du produit est mesurée directement à l'intérieur du tube (sonde Ellab TM9608) et enregistrée en continu à l'aide du système (Ellab E-val Basic v2.10). La durée du traitement à une température déterminée est définie en utilisant la méthode de Bigelow :

$$t = \sum \Delta t_i * 10^{\frac{T_i - T}{z}}$$

VP = Valeur pasteurisatrice

T = Température de chauffe

t = Temps de chauffe à température T

T_i = Température de l'intervalle i

Δt_i = Temps de l'intervalle i

z = Température de réduction décimale

Le microorganisme de référence utilisé est *Enterococcus faecalis* avec une température de réduction décimale (z) de 10 °C. La courbe de température théorique appliquée est représentée par la courbe noire de la figure 3. Elle a été établie sur base d'une évolution moyenne de la température du produit au cours du traitement de microfluidisation.

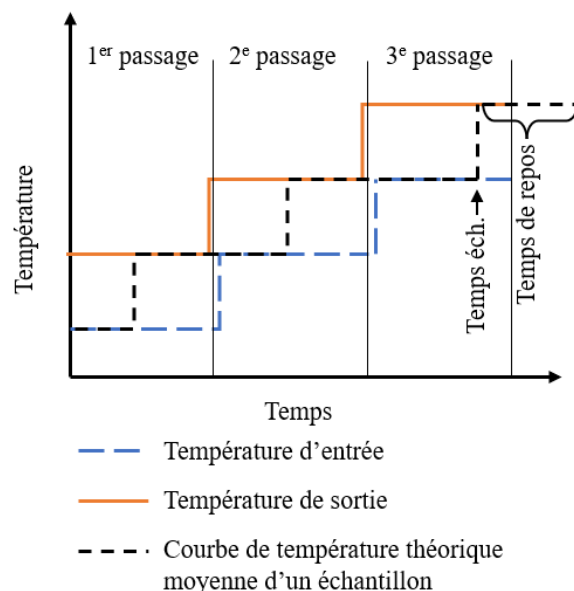


Figure 3 : Établissement de la courbe de température théorique moyenne d'un échantillon de lait pendant le traitement de microfluidisation

Avant un essai, les tubes sont remplis avec la solution de nettoyage utilisée pour la microfluidisation et mis au repos pendant 15 minutes. Ensuite, les tubes sont rincés à l'eau distillée et séchés avant d'être mis à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

Le chronomètre est lancé quand la température affichée par la sonde atteint 2 °C en dessous de la température cible afin de prendre en compte le temps de latence. Quand le temps défini est atteint, le tube est directement plongé dans un mélange eau-glace. Le lait refroidi est ensuite transvasé dans un récipient stérile de 100 ml (Schott – Duran) directement plongé dans un mélange eau-glace.

L'ensemble des essais pilotes de traitement thermique est repris dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Liste des essais pilotes de traitements thermiques

Numéro	Type	Température	Date
P04	Traitement thermique	70 °C	20/03/2023
P05	Traitement thermique	70 °C	27/03/2023
P07	Traitement thermique	70 °C	17/04/2023
P12	Traitement thermique	70 °C	22/05/2023
P13	Traitement thermique	60 °C	22/05/2023
P14	Traitement thermique	70 °C	02/06/2023
P15	Traitement thermique	60 °C	08/06/2023
P19	Traitement thermique	60 °C	30/06/2023
P20	Traitement thermique avec du lait UHT (Étude de la contamination)	60 °C	30/06/2023

4.4. Analyses microbiologiques

Le dénombrement des microorganismes a été réalisé le jour même de l'essai. Durant le laps de temps entre l'essai et l'analyse microbiologique, les échantillons sont conservés dans un mélange d'eau et de glace (0 °C).

Trois flores différentes ont été étudiées :

- La détermination de la flore aérobique mésophile totale est réalisée par inoculation en profondeur de l'échantillon dans une gélose PCA (Plate Count Agar – Bio-Rad) et incubation à 30 °C pendant 72 h selon la norme ISO 4833:2003.
- La flore aérobique psychrotrophe est déterminée sur le même type de gélose PCA à 7 °C pendant 10 jours.
- Les bactéries lactiques sont inoculées en profondeur dans une gélose MRS (de Man Rogosa Sharpe Agar – Bio-Rad) et incubée à 30 °C pendant 72 h selon la norme ISO 15214:1998.

Une chambre thermostatée à 30 °C a été utilisée pour incuber les milieux à 30 °C et une chambre réfrigérée à 7 °C (ISA LAB GASTRONOMIA GE 700 SS+SS) a été utilisée pour la flore psychrotrophe. Afin d'économiser du matériel, les dilutions inoculées sont préalablement ciblées. Toutes les analyses ont été réalisées en duplicata.

4.5. Dosage des activités de la phosphatase alcaline et de la lactoperoxydase

Les échantillons destinés à la quantification des enzymes ont été prélevés dans des tubes de 15 ml (Falcon) et congelés dans une chambre froide à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avant analyse, ils ont été décongelés à température ambiante.

La quantification de l'activité de la phosphatase alcaline s'est déroulée selon la norme ISO 3356:2009. Une incubation à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (GFL 1083) permet à la phosphatase alcaline présente dans l'échantillon de libérer du phénol à partir du phénylphosphate disodique ajouté. Le phénol produit réagit ensuite avec une imidoquinone produisant du dibromo-indophénol de couleur bleue, mesurée à une longueur d'onde de 610 nm avec un photomètre (HITACHI U-2900 Spectrophotometer).

La quantification de l'activité de la lactoperoxydase s'est déroulée selon la spécification technique ISO/TS 17193:2011. La lactoperoxydase catalyse la réaction entre l'ABTS [2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline -6-acide sulfonique)] (Fluka Analytical) et le peroxyde d'hydrogène. La quantité de cations radicalaire ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) libérée par minute est proportionnelle à l'activité de la lactoperoxydase. L' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est mesuré par photométrie à 120 nm à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (thermostaté) (Shimadzu UV-2401PC UV-Vis Recording Spectrophotometer). Le milieu et les cuvettes ont été préalablement portés à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans une chambre thermostatée (Memmert 749 ICP 800).

5. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

5.1. Évolution de la qualité microbiologique du lait cru lors de la maturation, congélation et décongélation

L'évolution de la charge microbienne du lait après maturation et décongélation est exposée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Charge microbienne du lait cru frais, mûré et décongelé en \log_{10}

Libellé	Flore mésophile	Flore psychrotrophe	Bactéries lactiques
Lait frais	3,6	3,0	2,9
Lait mûré	6,1	6,1	4,8
Lait décongelé	7,7 +/- 0,5	7,3 +/- 0,4	7,0 +/- 0,8

Les résultats montrent que la flore mésophile du lait frais s'élève à 4000 ufc/ml. La qualité microbiologique du lait est donc très bonne par rapport à la moyenne géométrique wallonne de 15 600 ufc/ml et respecte la réglementation européenne 853/2004 (Comité du lait (CDL), 2023; Régulation Européenne (CE) N° 853/2004).

Lors de la phase de maturation, une augmentation globale de la charge microbienne est observée. Cependant, les résultats indiquent que les populations des différentes flores ont évolué différemment. La flore mésophile a augmenté de 2,5 \log_{10} , la flore psychrophile a augmenté de 3,1 \log_{10} et les bactéries lactiques de 1,9 \log_{10} . Par conséquent, la flore psychrotrophe s'est donc mieux développée conformément aux attentes. En effet, les bactéries psychrotrophes se développent plus rapidement à des températures de 15 à 20 °C (de Oliveira et al., 2015).

Enfin, les résultats obtenus montrent qu'une décongélation lente à 15 °C d'un grand contenant favorise la multiplication de la charge microbienne. Une augmentation moyenne 1,6 \log_{10} de la flore totale est observée, ce qui correspond avec les résultats de Tribst et al. (Tribst et al., 2019).

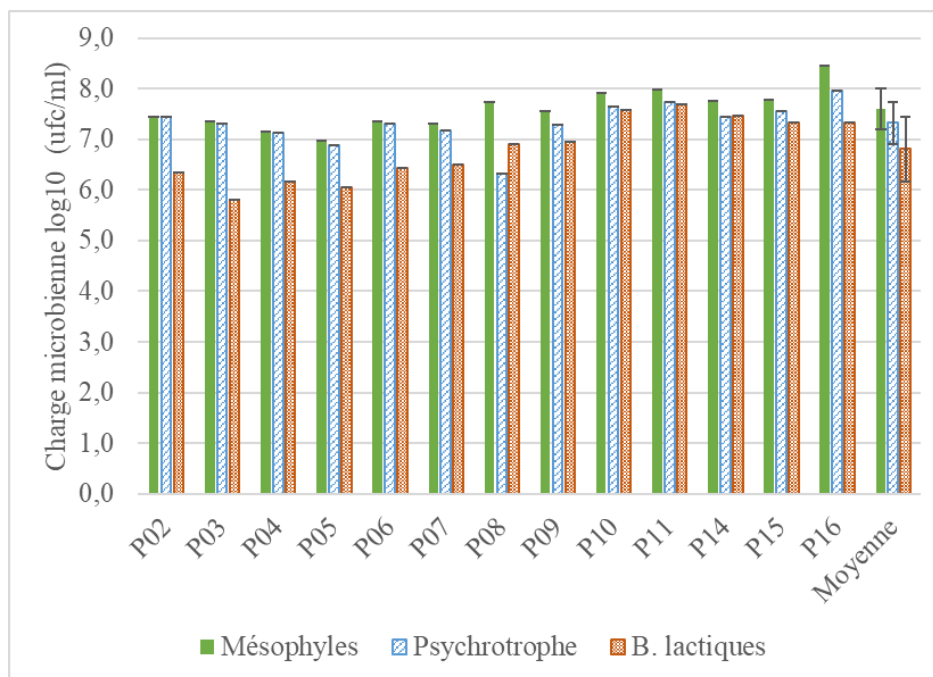


Figure 4 : Évolution de la charge microbienne du lait décongelé exprimé en log₁₀ ufc/ml

La Figure 4 permet d'observer l'évolution de la charge microbienne du lait décongelé pour chaque essai. En moyenne, les dénombrements étaient de $7,7 \pm 0,5$ pour la flore mésophile, $7,3 \pm 0,4$ pour la flore psychrotrophe et $7,0 \pm 0,8$ pour les bactéries lactiques. L'augmentation du pourcentage de bactéries lactiques par rapport à la charge totale peut être également due à un changement dans l'écosystème du lait suite à la mort de certaines bactéries comme *E. coli* ou des *Enterobacteriaceae* plus sensible à la congélation (Biondi et al., 2021).

Bien que la charge microbienne entre les essais semble relativement stable, deux tendances se distinguent cependant. De l'essai P02 à P07, les dénombrements des flores mésophile et psychrotrophe sont proches ($7,3 \pm 0,2$ et $7,2 \pm 0,2$ log₁₀ ufc/ml). Les bactéries lactiques sont dix fois moins représentées avec une moyenne de $6,2 \pm 0,3$ log₁₀ ufc/ml. Par contre, de l'essai P08 à P16, le dénombrement des trois flores montre une augmentation significative des populations avec pour les mésophiles $7,9 \pm 0,3$ log₁₀ ufc/ml, les psychrotrophes $7,4 \pm 0,5$ log₁₀ ufc/ml et les bactéries lactiques $7,3 \pm 0,3$ log₁₀ ufc/ml. Cette augmentation est probablement due à une évolution de la température durant des périodes de forte chaleur dans la chambre climatisée à 15 °C et dans le hall pilote où se sont déroulés les essais.

Malgré une variation de la charge microbienne du lait après la décongélation, ce protocole présente une série d'avantages. Premièrement, tous les essais de l'étude ont été réalisés avec un même lot de lait cru, ce qui limite fortement l'introduction de biais liés à des variations dans la composition. Deuxièmement, la flore initiale du lait provient du même lot et est donc semblable. Troisièmement, la flore s'est développée dans des conditions similaires. Ces deux derniers critères sont primordiaux pour une bonne répétabilité, car l'efficacité du traitement est dépendante de la biodiversité de la flore (Donsi et al., 2009; Mercan et al., 2018; Picart et al., 2006).

La létalité d'une congélation lente n'a pas pu être observée dans cette étude puisqu'une décongélation rapide d'un échantillon représentatif n'a pas été possible en raison du volume de l'échantillon (Biondi et al., 2021).

5.2. Impact de la microfluidisation sur la charge microbienne

5.2.1. Impact de la combinaison de l'effet mécanique et thermique

Le Tableau 4 montre l'évolution de la charge microbienne contenue dans le lait pour différents traitements appliqués (nombre de passages différent) sans système de refroidissement.

Les résultats obtenus montrent que les réductions de la flore microbienne augmentent à chaque passage. Pour le premier essai (P06), l'ensemble des flores analysées sont à leur niveau minimum après trois passages. La flore psychrotrophe et les bactéries lactiques ne sont plus détectables avec des réductions respectives de 7,3 et 6,4 log₁₀ ufc/ml. La flore mésophile s'est stabilisée entre 27 et 39 ufc/ml. Pour le second essai (P09), les résultats montrent une réduction de la flore mésophile de 5,7 log₁₀, de la flore psychrotrophe de 5,9 log₁₀ et des bactéries lactiques de 6,9 log₁₀. Les différences observées sont notamment expliquées par la légère différence de pression appliquée lors du traitement, consécutive à un problème d'étanchéité rencontré lors des tests. Ce problème a également impacté les températures atteintes par le produit en cours de test.

Par conséquent, des réductions plus importantes sont observées pour l'essai P06 par rapport à l'essai P09.

Tableau 4 : Analyses microbiologiques après microfluidisation (Essais P06 et P09)

N ^a	Flore mésophile		Flore psychrotrophe		Bactéries lactiques		T ^b °C
	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	
Essai P06 — 150 MPa — 31/03/23							
0	2,3E+07		2,0E+07		3,1E+06		19
1	4,4E+06	0,7	6,7E+07	1,5	1,9E+06	0,2	48
2	9,4E+03	3,4	100	5,3	90	4,5	58
3	39	5,8	< 1 ^c	7,3	< 1 ^c	6,4	67
4	27	5,9	< 1 ^c	7,3	< 1 ^c	6,4	71,5
5	29	6,0	< 1 ^c	7,3	< 1 ^c	6,4	76,5
Essai P09 — 145 MPa — 05/05/23							
0	3,7E+07		1,9E+07		8,9E+06		17,1
1	9,7E+06	0,6	1,8E+06	1,0	> 3,0E+06 ^e	< 0,5	43,5
2	7,3E+05	1,7	-	-	2,2E+05	1,6	52,3
3	> 3,0E+04 ^e	< 3,1	2,1E+04	3,0	660	4,1	58,4
4	3,3E+03	4,1	300	4,8	23	5,6	67,4
5	78	5,7	26	5,9	1 ^d	6,9	68,3

Légende : a) Nombre de passages b) Température de sortie c) Non détecté d) Estimation, car le nombre de colonies est inférieur à 15. e) Nombre de colonies dans la boîte supérieur à 300.

L'observation graphique, visible sur la Figure 5, permet d'établir des régressions linéaires pour l'augmentation de la réduction microbienne en fonction du nombre de passages (Tendances des flores mésophiles : Essai P06 : $y = 1,3x - 0,75$, $R^2 = 0,995$; Essai P09 : $y = 2,5x - 1,8$, $R^2 = 0,999$). L'analyse des équations montre que la cinétique de la réduction de la charge

microbienne est fortement différente entre les deux essais. La température de sortie, plus importante après le premier passage, entraîne des températures d'entrées plus élevées pour les passages suivants. Cette différence de $6,2 \pm 2,1$ °C permet d'obtenir une charge microbienne faible après 3 passages au lieu de 5.

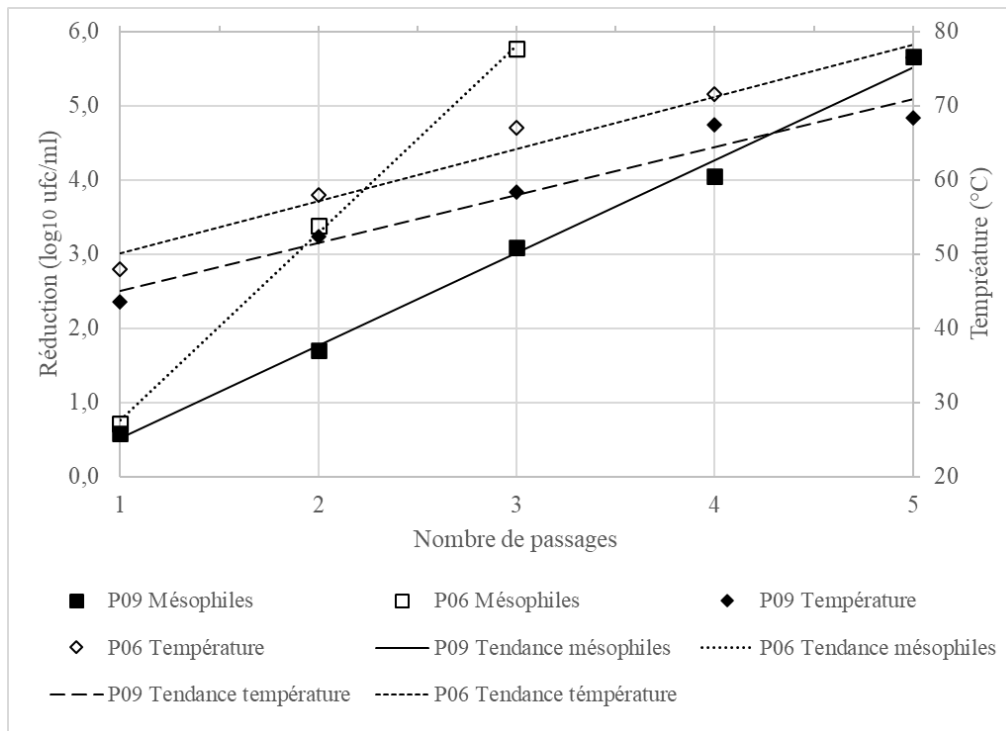


Figure 5 : Évolution de la réduction de la charge microbienne et de la température en fonction du nombre de passage au Microfluidizer®. (Essais P06 et P09)

Finalement, les résultats montrent que les réductions obtenues par le couplage de l'effet de cisaillement et de l'effet thermique sont importantes et permettent d'atteindre les barèmes de pasteurisation recommandés par le Codex Alimentarius (2009). De plus, les températures atteintes par le produit sont en dessous des températures communément appliquées au cours d'une pasteurisation limitant les effets négatifs de l'échauffement du lait (Jo et al., 2018). Bucci et al. a également observé une meilleure efficacité du traitement par microfluidisation avec une augmentation de la température d'entrée (Bucci et al., 2018). Aucune étude actuellement disponible n'inclut l'effet thermique d'un traitement continu à haute pression.

5.2.2. Impact du cisaillement sans échauffement

Lors de cette seconde phase d'essais, seul l'effet de cisaillement est observé. Le lait étant refroidi directement après la microfluidisation. Les données obtenues (Tableau 5) montrent une réduction modérée de la flore totale mésophile et des bactéries lactiques. Le nombre de colonies dans le lait initial est plus élevé que la normale, les dilutions effectuées pour les essais de 3 à 5 ne sont pas suffisantes, par conséquent, une partie des résultats n'est pas quantifiable. La réduction après 5 passages est inférieure à 1 log₁₀ pour la flore mésophile et 1,9 log₁₀ (1 log₁₀ pour 4 passages) pour les bactéries lactiques. Une réduction de 2,5 log₁₀ est observée pour la flore psychrotrophe.

Tableau 5 : Analyses microbiologiques après microfluidisation avec refroidissement immédiat (Essai P16)

N ^a	Flore totale mésophile		Flore totale psychrotrophe		Bactéries lactiques	
	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀
0	2,8E+08	-	9,0E+07	-	2,2E+08	-
1	1,8E+08	0,2	8,4E+06	1,0	1,7E+08	0,1
2	9,7E+07	0,5	1,6E+06	1,7	9,1E+07	0,4
3	> 3,0E+07 ^b	< 1,0	5,3E+05	2,2	> 3,0E+07 ^b	< 0,9
4	> 3,0E+07 ^b	< 1,0	5,3E+05	2,2	> 3,0E+07 ^b	< 0,9
5	> 3,0E+07 ^b	< 1,0	3,0E+05	2,5	> 3,0E+06 ^b	< 1,9

Légende : a) Nombre de passages b) Le nombre de colonies dans les boites est supérieur à 300.

L'échauffement moyen après un passage est de 27 °C (décrits dans la section suivante, point 5.2.2), avec une température d'entrée de 21,4 °C, la température entre la chambre et l'échangeur thermique ne dépasse pas 48 °C. À cette température, la flore microbienne du lait n'est pas impactée par la température (Pearce et al., 2012). La réduction microbienne due à l'effet de cisaillement est légèrement inférieure aux résultats obtenus précédemment au laboratoire dans le cadre du travail de fin d'études de Louise Goffin. Lors d'un passage à 125 MPa avec une température d'entrée de 20 °C, les réductions sont de 0,3-0,6 log₁₀ pour la flore mésophile, 0,7-1,7 log₁₀ pour les psychrotrophes et 0,3-1 log₁₀ pour les bactéries lactiques. Cependant, une réduction de 1,6 à 3,3 log₁₀ de la flore psychrotrophe a été observée après 5 passages dans ce précédent travail (Goffin, 2021). Dans la littérature, des réductions plus élevées sont observées pour des jus de fruits. Avec une température contrôlée à 25 °C et une chambre d'interaction en « Y », la réduction charge microbienne d'un jus de Sapotille est 0,2 pour 1 passage, 1,94 pour 2 passages et 2,46 pour 3 passages (S. V. Singh et al., 2022). Pour un jus de canne à sucre, 1 passage à 150 MPa a réduit la flore totale de 2,4 et après 5 passages, aucun microorganisme n'a été détecté (Tarafdar et al., 2021). Les caractéristiques physicochimiques des produits employés sont probablement responsables de cette différence puisque la configuration en « Y » de la chambre est en théorie moins efficace pour la destruction de cellules.

5.2.3. Impact de la microfluidisation sur la température du produit

La microfluidisation entraîne une augmentation de la température du lait visible sur la Figure 6. Après le premier passage, la température augmente de presque 27 °C. Ensuite, l'augmentation de température du 2^e au 4^e passage est seulement de 7,2 à 8,7 °C. Le 5^e passage présente l'augmentation la plus faible avec seulement 2,5 °C (Tableau 6). De plus, à partir du 2^e passage, la température du lait dans le récipient de sortie augmente de manière linéaire au cours de chaque passage.

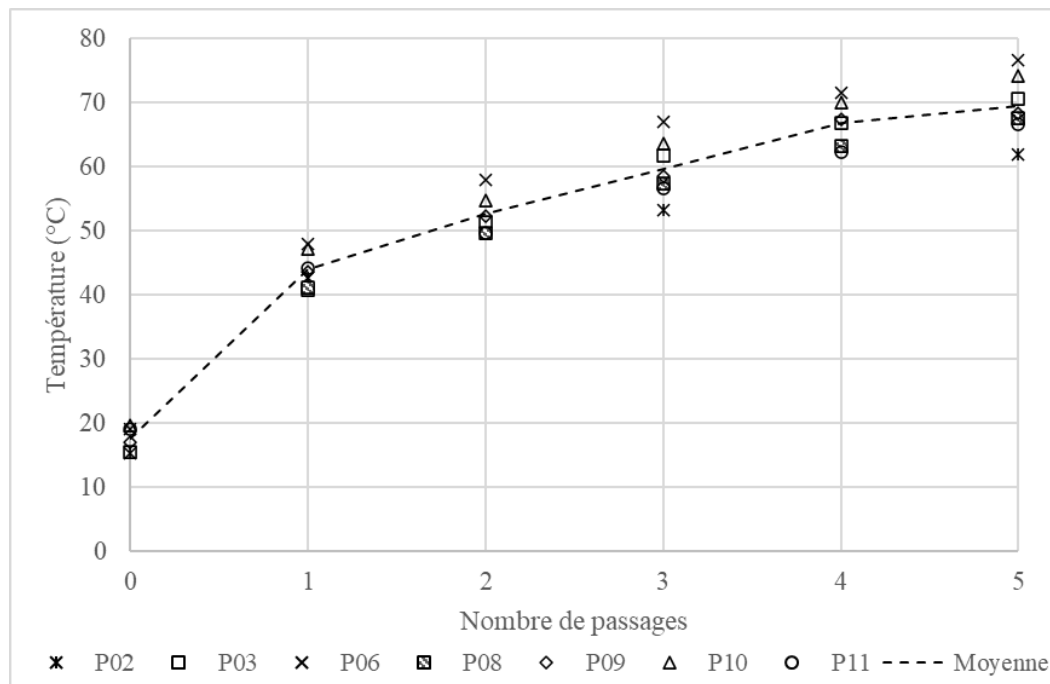


Figure 6 : Évolution de la température pendant la microfluidisation en fonction du nombre de passages.

Tableau 6 : Évolution de la température au cours de la microfluidisation en fonction du nombre de passages. Valeurs exprimées en degrés Celsius.

Passage	P02	P03	P06	P08	P09	P10	P11	Moyenne ^a	Augmentation ^b
0	15,3	15,5	19	-	17,1	19,7	19	17,6 ± 1,9	-
1	42,7	40,7	48	41,1	43,5	47,1	44,1	43,9 ± 2,8	26,8 ± 3,4
2	-	51,3	58	49,6	52,3	54,8	49,6	52,6 ± 3,3	8,7 ± 4,3
3	53,2	61,6	67	57,3	58,4	63,5	56,6	59,7 ± 4,7	7,1 ± 5,7
4	-	66,8	71,5	63,2	67,4	69,9	62,3	66,8 ± 3,6	7,2 ± 5,9
5	61,9	70,6	76,5	67,5	68,3	74,2	66,5	69,4 ± 4,9	2,5 ± 6,1

Légende : a) Moyenne et écart-type standard. b) Différence de la température moyenne entre le passage et le précédent, et écart-type standard.

Dans la littérature, l'augmentation de la température suite à un traitement de microfluidisation est de 17 à 21 °C (Bucci et al., 2018; Feijoo et al., 1997; Microfluidics, 2014). L'augmentation observée lors du premier passage correspond avec 17,8 °C par 100 MPa. Les passages suivants ne correspondent pas avec la littérature où une température d'entrée plus élevée ne diminue pas la différence de température entre l'entrée et la sortie (Feijoo et al., 1997).

L'augmentation linéaire de la température dans le récipient sortie suppose une mise à température de l'appareil. En effet, des pertes de chaleur sont possibles par les tuyauteries qui doivent atteindre la température du lait. Ces pertes ne sont pas observées lors du premier passage puisque la mise en condition de l'appareil avec de l'eau distillée permet à la tuyauterie d'atteindre la température de sortie. De plus, l'eau distillée à température ambiante ajoutée entre les passages ayant pour effet de refroidir la tuyauterie à partir du 3^e passage. Pour finir, les courbes de températures plus importantes observées P06 et P10 avec l'appareil déjà chaud appuient cette hypothèse. Un essai plus long avec une température d'entrée élevée est cependant nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

5.2.4. Impact de l'application d'un traitement thermique équivalent à celui générer lors de la microfluidisation

En parallèle de chaque essai, un traitement thermique équivalent à la courbe de température subie durant la microfluidisation est calculé selon la méthode de Bigelow et repris dans le Tableau 7. Lors de l'essai P11, la température de l'échantillon pendant le temps de repos a été suivie et l'inclusion de la variation de température a fortement diminué le barème temps/température du traitement thermique.

Tableau 7 : Comparaison de la réduction de la charge microbienne mésophile entre la microfluidisation et le traitement thermique.

Temps de repos (Essai)	N ^a	Microfluidisation		Traitement thermique			Différence
		Température °C ^b	Réduction log ₁₀	Température °C ^c	Temps	Réduction log ₁₀	
0 min (P09)	2	52,3	1,7	60	5 s	0,4	1,3
	4	67,4	4,1	70	26 s	3,3	0,8
	5	68,3	5,7	70	1 min 49 s	5,2	0,5
3 min (P03)	3	53,2	5,5	70	38 s	4,2	1,3
	5	61,9	6,0	70	6 min 35 s	5,1	0,9
3 min (P10)	3	63,0	5,0	60	6 min 55 s	2,9	2,1
	4	68,5	6,3	70	2 min 46 s	5,4	0,9
5 min (P04)	3	61,6	5,2	70	2 min 53 s	4,8	0,4
	5	70,6	5,6	70	8 min 32 s	4,9	0,7
5 min (P11)	3	56,0	2,8	60	2 min	2,7	0,1
	4	61,6	5,3	70	44 s	3,7	1,6
	5	69,0	6,5	70	4 min 42 s	5,5	1,0
5 min Ech. inclus ^d (P11)	3	56,0	2,8	60	5 s	0,4	2,4
	4	61,6	5,3	60	41 s	1,9	3,4
	5	69,0	6,5	70	3 min 31 s	5,2	1,3

Légende : a) Nombre de passages b) Température de l'échantillon à début du temps de repos c) Température de chauffe d) La température de l'échantillon pendant le temps de repos a été incluse au calcul du temps de chauffe.

Les résultats de la flore mésophile regroupés dans le Tableau 7 montrent une meilleure efficacité du traitement par microfluidisation par rapport au traitement thermique calculé correspondant. Une meilleure efficacité d'environ 2 log₁₀ est observée pour la flore psychrotrophe. Pour les bactéries lactiques, les réductions sont améliorées de 0,7 à 2,1 log₁₀. Cependant, la variabilité importante entre les essais ne permet pas de déterminer une efficacité en fonction du nombre de passages. Par la suite, l'inclusion de l'évolution de la température de l'échantillon durant le temps de repos diminue le temps du traitement thermique et, par conséquent, augmente l'efficacité de la microfluidisation par rapport au traitement thermique. Dès lors, l'efficacité pour les essais avec temps de repos a été sous-estimée vu la température réelle de l'échantillon pendant ce temps.

La comparaison de la microfluidisation et d'un traitement thermique équivalent permet d'étudier les deux effets de la microfluidisation. D'une part, le traitement thermique équivalent à celui généré lors de la microfluidisation reflète l'effet thermique de ce traitement. D'autre part, la différence entre les réductions de la microfluidisation et du traitement thermique exprime l'effet mécanique. Les différences observées confirment l'impact de l'effet de cisaillement, cependant, l'impact de l'échauffement sur la flore microbienne est plus important que l'impact du cisaillement.

5.2.5. Évaluation de la contamination endogène au protocole

Les essais avec du lait UHT montrent une présence d'une contamination endogène au protocole. (

Tableau 8). Une contamination de bactéries mésophiles de plus de 3000 ufc/ml est présente après le premier passage au *Microfluidizer*®. Après trois passages, une réduction d'un facteur dix est observée. Après 5 passages, moins de 25 microorganismes par millilitres sont présents. Une présence plus importante est observée avec un temps de repos dû à la sonde de température qui empêche le serrage du couvercle. Lors du traitement thermique, une contamination de la flore mésophile de 350 ufc/ml avant le traitement est dénombrée puis réduite à 41 ufc/ml après un traitement thermique de 70 °C pendant 2 minutes.

Tableau 8 : Évaluation de la contamination endogène du matériel utilisé

Protocole	Échantillon	Flore mésophile ufc/ml	Bactéries lactiques ufc/ml
-	Lait UHT initial	9 ^a	2 ^a
Microfluidisation	Lait initial	12 ^a	1 ^a
	1 passage — 0 min	> 3000 ^b	> 300 ^b
	3 passages — 0 min	410	2 ^a
	3 passages — 5 min	156 ^c	3 ^a
	5 passages — 0 min	1 ^a	1 ^a
	5 passages — 5 min	25	1 ^a
	Traitement thermique	Lait initial	350
2 min — 70 °C		41	3 ^a

Légende : a) estimation, nombre de colonies dans les boîtes inférieur à 15. b) Nombre de colonies dans les boîtes supérieur à 300. c) Variabilité trop élevée, quantification non acceptable.

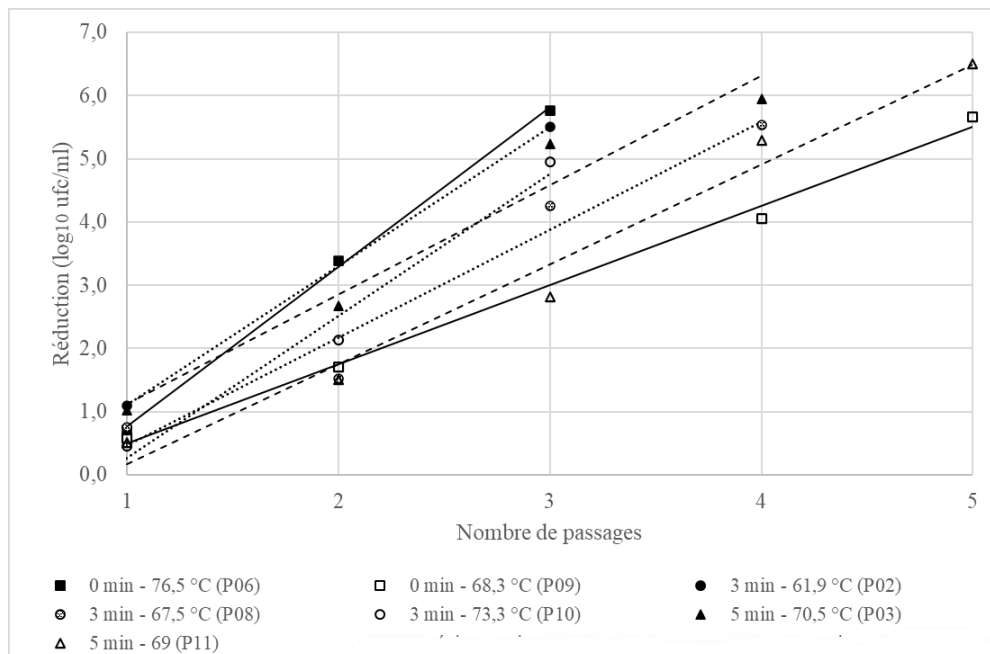
Malgré une contamination importante après le 1^{er} passage au *Microfluidizer*®, la charge microbienne du lait utilisé ($5,0 \times 10^7$ ufc/ml) est supérieur d'un facteur 1000. Cette contamination est négligeable vu que les analyses microbiologiques ne retiennent que 2 chiffres significatifs et que les dénombrements initiaux et du 1^{er} passage sont supérieurs à 10^6 . Cependant, l'essai avec du lait frais ($5,5 \times 10^4$ ufc/ml) est plus sensible à cette contamination, mais présente des résultats cohérents. De plus, la contamination n'est pas composée de bactéries plus résistantes puisqu'elles sont également réduites par le traitement. La contamination avec des bactéries lactiques est moins importante et rapidement réduite. Les sources de contaminations sont principalement dues à l'absence de stérilisation du *Microfluidizer*®, l'utilisation de verreries non stérile et aux manipulations dans un environnement non stérile.

Pour le protocole du traitement thermique, la contamination du lait est moindre. Les contaminations sont dues à des bactéries qui ont survécu à la stérilisation des tubes, à l'utilisation de matériel non stérile pour injecter le lait dans les tubes et aux manipulations dans un environnement non stérile.

En résumé, ces contaminations peuvent être réduites en utilisant du matériel stérile et en travaillant dans un environnement propre. La contamination n'influence pas les résultats présentant un dénombrement supérieur à 10^3 pour la flore mésophile ou 10 pour les bactéries lactiques. Les analyses avec des charges microbiennes inférieures doivent être davantage discutées puisque les germes résiduels peuvent provenir d'une contamination durant l'essai.

5.2.6. Impact du temps de repos à la sortie du traitement de microfluidisation

Après réalisation du traitement, les échantillons sont restés à la température de sortie du procédé 0, 3 ou 5 minutes (Figure 7).



Légende : temps de repos — température après le 5e passage (Essai pilote)

Figure 7 : Réduction logarithmique en fonction du nombre de passages avec des temps de repos différents.

Le temps de repos n'a pas d'impact visible sur la réduction de la charge microbienne à cause de plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'effet thermique détruit les microorganismes présents dans le lait à une température supérieure à 60 °C (Picart et al., 2006; Van Brandt et al., 2011; Wittwer et al., 2022). En dessous de 3^e passage, le temps de repos n'atteint pas une température suffisante et n'impacte donc pas les microorganismes. Ensuite, les dénombrements résiduels obtenus à partir du 3^e passage ne permettent pas d'observer l'impact supplémentaire du temps de repos. De plus, la température des échantillons placés à température ambiante diminue pendant le temps de repos (Tableau 9) ce qui impacte la cinétique de destruction thermique des microorganismes dans le lait, en particulier aux alentours de 60 °C à 70 °C (Pearce et al., 2012). Pour finir, la variation de la température entre les essais impacte fortement les réductions

obtenues. Par conséquent, l'impact seul du temps de repos est difficile à établir. En résumé, un temps de repos dans ces conditions n'est pas pertinent pour obtenir de meilleures réductions.

Tableau 9 : Évolution de la température durant le temps de repos (Essai P11)

Temps (min)	1 passage	2 passages	3 passages	4 passages	5 passages
0	42,1	49,6	56,6	61,5	69,4
3	40,9	46,9	53,3	57,5	65,9
5	40,1	46,0	51,9	55,9	63,4

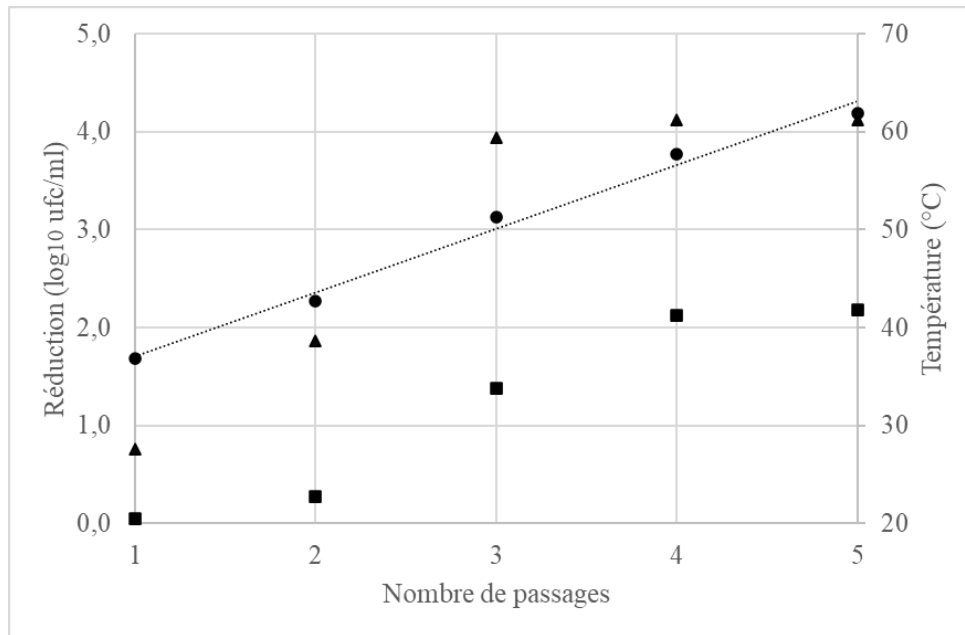
5.2.7. Validation des résultats sur un lait cru frais

Pour valider les résultats obtenus sur un lait maturé contaminé, un essai a été réalisé directement sur un lait frais. Les résultats montrent que la microfluidisation réduit la charge microbienne d'un lait cru frais (Tableau 10). La réduction de la flore mésophile est de 1,4 log₁₀ ufc/ml après 3 passages. Ensuite, la flore mésophile a été réduite de 2,2 log₁₀ ufc/ml et atteint 360 ufc/ml après 5 passages. Les résultats du 4^e et 5^e passage pour la flore mésophile ne sont pas significativement différents. La flore psychrotrophe a été réduite en dessous de la limite de quantification après 3 passages (Figure 8). Les colonies de bactéries lactiques de cet essai étaient particulièrement petites et difficilement repérables à l'œil nu. La quantification est peu fiable, mais après 5 passages aucune colonie n'est présente. Vu la température d'entrée plus basse, la température de chaque passage est inférieure à la température moyenne observée avec le lait maturé. Cependant, les augmentations de température entre les passages sont similaires aux augmentations observées pour le lait maturé.

Tableau 10 : Analyses microbiologiques de l'impact de la microfluidisation sur un lait cru frais. (Essai P17)

N ^a	Flore mésophile		Flore psychrotrophe		Bactéries lactiques		T ^b °C
	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	Dénombrement ufc/ml	Réduction log ₁₀	
0	5,5E+04		1,3E+04		1,8E+03		9,3
1	4,9E+04	0,1	2,3E+03	0,8	2,8E+03	-0,2	36,8
2	2,9E+04	0,3	180	1,9	5,0E+03	-0,4	42,7
3	2300	1,4	1,5 ^c	3,9	450	0,6	51,3
4	410	2,1	1 ^c	4,1	1,5 ^c	3,1	57,7
5	360	2,2	1 ^c	4,1	< 1 ^d	3,3	61,9

Légende : a) Nombre de passage b) Température c) Estimation, le nombre de colonies dans la boîte était inférieur à 15 d) Non détecté



Légende : ■ Flore mésophile, ▲ Flore psychrotrophe
 ● Température, tendance : $y = 6,5x + 30$ $R^2 = 0,988$

Figure 8 : Évolution de la réduction microbienne et de la température en fonction du nombre de passages avec un lait frais (Essai P17)

Les réductions obtenues après microfluidisation du lait frais sont inférieures aux les résultats observés avec du lait mûré. Après trois passages, la réduction de la flore mésophile est de seulement 1,4 log₁₀ ufc/ml contre 5,8 dans l'essai P06 et 3,1 dans l'essai P09. La flore psychrotrophe et les bactéries lactiques ont atteint un niveau résiduel après 3 et 4 passages conformément aux résultats avec du lait mûré. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la destruction plus faible de la flore mésophile. Pour commencer, les microorganismes disposent chacun d'une résistance particulière au traitement de microfluidisation (M. Liu et al., 2021). Le lait utilisé ne possède pas la même biodiversité que le lait mûré, par conséquent, la cinétique de destruction peut être différente. Par la suite, les températures plus basses diminuent l'effet thermique du traitement et la fragilité des membranes face à l'effet de cisaillement (Bucci et al., 2018; Feijoo et al., 1997). Pour finir, les variations entre le 4e et le 5e passage montrent probablement une contamination de l'échantillon.

5.2.8. Conclusion de l'impact sur la charge microbienne

Les effets mécanique et thermique du traitement par microfluidisation ont été étudiés. Pour commencer, l'effet de cisaillement dû au stress d'élongation et à la cavitation (Floury et al., 2004) a faiblement réduit la charge microbienne du lait même après 5 passages. Contrairement, aux études sur des jus de fruits (Kohli et al., 2019; S. V. Singh et al., 2022; Tarafdar et al., 2021), l'utilisation de l'effet mécanique seul n'est pas envisageable avec du lait. Ensuite, pour étudier l'effet thermique dû à la conversion de l'énergie cinétique (Bucci et al., 2018), le lait a été soumis à des traitements thermiques équivalents. Les réductions microbiennes de l'effet thermique seul sont inférieures à la combinaison des deux effets. Ces résultats confirment la composante mécanique de la destruction cellulaire lors de la microfluidisation. Par la suite, l'étude de l'impact du temps de repos à la température de sortie afin d'augmenter l'effet thermique n'a établi aucun impact significatif avec le protocole utilisé.

Pour confirmer ces résultats, l'évaluation de la contamination endogène du procédé a permis de détecter une contamination significative pour les résultats à faible charge microbienne. Par conséquent, certaines réductions des 3^e, 4^e et 5^e passages sont sous-estimées. De plus, un essai avec du lait frais a confirmé l'efficacité de la combinaison des deux facteurs sur un produit utilisé dans l'industrie laitière.

Pour conclure, la combinaison des facteurs mécanique et thermique de la microfluidisation permettent d'atteindre les barèmes de pasteurisation fixés par le Codex Alimentarius (2009). En tenant compte de la contamination résiduelle possible, 3 à 5 passages sont nécessaires pour atteindre une réduction de 5 log₁₀. Ces variations dépendent de la montée en température du produit. Lorsque la température du produit est plus importante, 3 passages sont suffisants pour atteindre un barème de pasteurisation. Pour finir, aucune étude incluant l'effet thermique d'un traitement continu à haute pression n'a été trouvée dans la littérature disponible.

5.3. Impact de la microfluidisation sur la présence enzymatique

5.3.1. Impact sur l'activité de la phosphatase alcaline

5.3.1.1. Impact de la microfluidisation sur l'activité phosphatase alcaline

Les résultats obtenus montrent une diminution très importante de l'activité enzymatique à partir du troisième passage (Tableau 11). Au-delà, l'activité atteint des niveaux très faibles. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. Pour commencer, le cisaillement peut avoir un effet. Bucci et al. a observé une diminution drastique de l'activité lors d'un passage à 125 MPa avec une température d'entrée de 42 °C. Contrairement aux observations de Bucci et al., le premier passage à 150 MPa n'a pas engendré une diminution de l'activité. Même avec un deuxième passage à une température d'entrée de 40 °C, aucune diminution n'est constatée (Essai P09 et P11). Ensuite, la température atteinte par le lait peut avoir un impact sur la diminution de l'activité. En effet, l'activité de la phosphatase alcaline est réduite à des niveaux résiduels en moins de 2 minutes à 65 °C et 1 minute à 68 °C (Wilińska et al., 2007). Lors des 4^e et 5^e passages, les températures supérieures à 67 °C (excepté 4^e passage de l'essai P11) ont contribué à réduire l'activité de l'enzyme (Figure 9). En outre, les températures de sortie après le 3^e passage pour l'essai P09 et P11 (58 et 56 °C) et après le 2^e passage pour l'essai P10 (54,6 °C) ne suffisent pas à diminuer rapidement de 85 % l'activité relative (Wilińska et al., 2007). En définitive, la combinaison des deux effets de la microfluidisation réduit l'activité de la phosphatase alcaline. Cependant, l'absence de diminution significative au 1^{er} et 2^e passage indique que l'activité de la phosphatase alcaline n'est pas impactée par le traitement de microfluidisation à des températures de sorties inférieures à 52,4 °C.

Par la suite, les activités initiales de la phosphatase alcaline respectent les gammes de valeurs observées dans la littérature (Klotz et al., 2008). La différence observée pour l'essai P10 lors deux premiers passages est probablement due à une mauvaise manipulation de petits volumes (inférieurs à 1 ml).

Tableau 11 : Activités de la phosphatase alcaline (μg de phénol/ml) après microfluidisation

Nombres de passages	Microfluidisation avec temps de repos		
	0 min (Essai P09)	3 min (Essai P10)	5 min (Essai P11)
0	3129,8	4679,1	3265,0
1	3275,4	3701,7	3088,2
2	2880,3	1601,3	2911,4
3	218,4	41,6	438,8
4	2,2	6,3	3,6
5	2,1	4,2	3,7

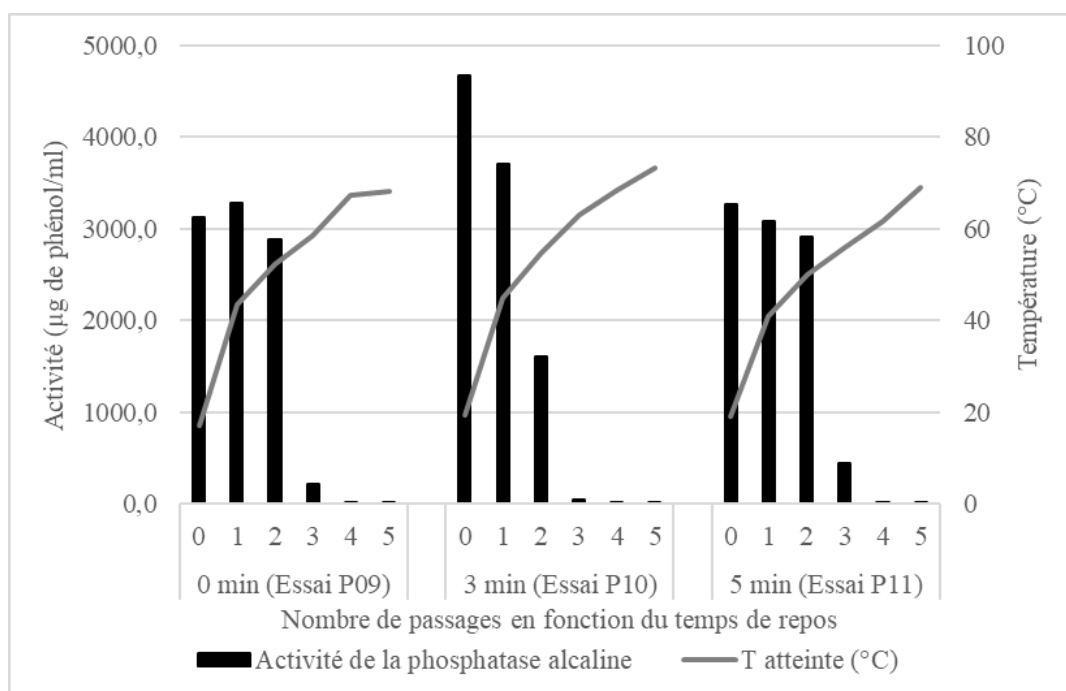


Figure 9 : Évolution de l'activité de la phosphatase alcaline après microfluidisation

5.3.1.2. Impact d'un traitement thermique correspondant sur l'activité de la phosphatase alcaline

Le Tableau 12 montre une comparaison des activités enzymatiques d'un traitement de microfluidisation et d'un traitement thermique correspondant à celui généré durant la microfluidisation. Après un traitement thermique à 70 °C durant plus de 44 secondes, l'activité de la phosphatase alcaline a atteint des niveaux résiduels conformément aux résultats obtenus dans la littérature (Klotz et al., 2008; Lorenzen et al., 2010). Ensuite, les traitements à 60 °C montrent une diminution lente de l'activité. Ces résultats suivent la cinétique d'inactivation de l'enzyme observée par Wilinska et al. (Wilińska et al., 2007).

Les résultats montrent que la microfluidisation diminue l'activité de la phosphatase alcaline à des températures plus basses que celles observées par traitement thermique. Ces observations confirment l'impact du cisaillement sur la phosphatase alcaline, également observé par Bucci et al. (Bucci et al., 2018). Le 3^e passage de l'essai P11 montre une meilleure efficacité du traitement thermique. Cependant, la différence de température plus élevée entre sa température de sortie (54 °C) et la température utilisée (70 °C) diminue la fiabilité de la comparaison en raison de la sensibilité de l'enzyme à ces températures. Un traitement thermique correspondant de 60 °C pendant 2 minutes serait plus adéquat pour limiter le biais.

Tableau 12 : Activités de la phosphatase alcaline (μg de phénol/ml) après microfluidisation et traitement thermique

Microfluidisation			Traitement thermique		
Temps de repos	Nombres de passages	Activité	Température (°C)	Temps	Activité
0 min (Essai P09)	3	218,4	60	32 s	2724,3
	4	2,2	70	26 s	253,7
	5	2,1	70	1 min 49 s	2,2
3 min (Essai P10)	3	41,6	60	6 min 55 s	572,9
	4	6,3	70	2 min 46 s	1,8
	5	4,2	70	9 min 11 s	0,9
5 min (Essai P11)	3	438,8	70	12 s	71,7
	4	3,6	70	44 s	6,2
	5	3,7	70	4 min 42 s	1,1

5.3.2. Impact sur l'activité de la lactoperoxydase

5.3.2.1. Impact de la microfluidisation sur l'activité de la lactoperoxydase

L'activité de la lactoperoxydase est réduite à partir du 4^e passage pour les essais P09 et P11 et à partir du 3^e passage pour l'essai P10 (Tableau 13). Les réductions sont observées lorsque les températures de sortie sont supérieures à 60 °C (Figure 10). En effet, aucune différence majeure n'est observée pour les passages précédents à des températures inférieures. Malgré tout, un traitement de microfluidisation à 125 MPa avec une température d'entrée d'au moins 54,6 °C (essai P10) a un impact sur l'activité de l'enzyme. Dans la littérature, une autre technologie à haute pression, l'homogénéisation à haute pression, permet d'inactiver la lactoperoxydase à des pressions de 200 MPa avec une température d'entrée de 40 °C minimum (Hayes et al., 2005; Pereda et al., 2007). Les effets de cisaillement de la microfluidisation étant plus importants, une inactivation de l'enzyme à des pressions inférieures était attendue. Ensuite, une température d'entrée importante est nécessaire dans les deux cas. Afin de déterminer l'effet de la composante thermique sur l'inactivation de l'enzyme, une comparaison avec un traitement thermique équivalent est abordée dans le prochain point.

Tableau 13 : Activités de la lactoperoxydase (U/l) après microfluidisation

Nombres de passages	Microfluidisation avec temps de repos		
	0 min (Essai P09)	3 min (Essai P10)	5 min (Essai P11)
0	8486 ± 1319	5299 ± 850	6406 ± 280
1	7205 ± 511	5062 ± 413	6383 ± 288
2	7047 ± 358	5837 ± 399	6375 ± 153
3	7205 ± 521	4192 ± 300	6470 ± 356
4	1378 ± 77	Non détecté	387 ± 58
5	Non détecté	Non détecté	Non détecté

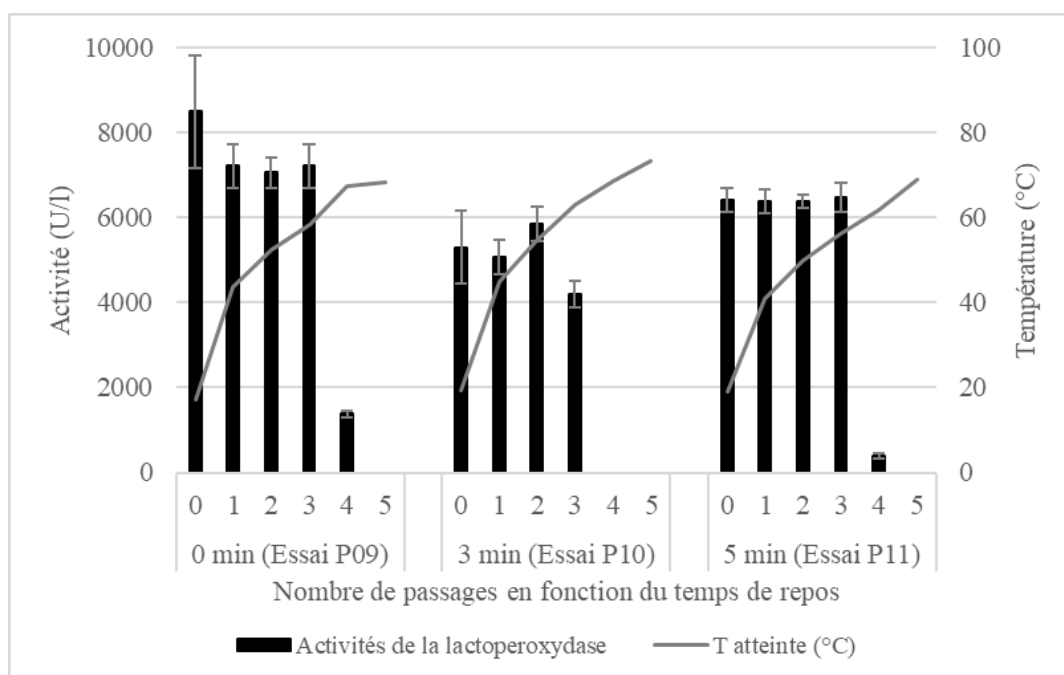


Figure 10 : Évolution de l'activité de la lactoperoxydase après microfluidisation

5.3.2.2. Impact d'un traitement thermique correspondant sur l'activité de la lactoperoxydase

Contrairement à la phosphatase alcaline, les traitements thermiques équivalents appliqués ne permettent pas de réduire l'activité de la lactoperoxydase (Tableau 14). Conformément à la littérature, les traitements thermiques à 70 °C de 12 secondes à 4 minutes 42 ne sont pas suffisants pour inactiver l'activité enzymatique (Dumitrașcu et al., 2012; Marín et al., 2003). Ces résultats confirment que l'effet mécanique de la microfluidisation réduit significativement l'activité de la lactoperoxydase. Lors traitements d'homogénéisation à haute pression, Datta et al. a également déterminé que des effets mécaniques ont un impact sur l'activité de l'enzyme (Datta et al., 2005). Pour finir, la microfluidisation a un impact sur la structure des protéines. En effet, Liu et al. a observé la destruction partielle d'hélices alpha sur une autre enzyme, la polyphénol oxydase (W. Liu et al., 2009). La lactoperoxydase contenant une vingtaine d'hélices alpha, le site actif de l'enzyme peut être impacté par la destruction de ces hélices. L'enzyme serait alors inactivée (A. K. Singh et al., 2008).

Tableau 14 : Activités de la lactoperoxydase (U/l) après microfluidisation et traitement thermique

Microfluidisation			Traitement thermique		
Temps de repos	Nombres de passages	Activité	Température (°C)	Temps	Activité
0 min	0	8486 ± 1319	-	-	6825 ± 347
	4	1378 ± 77	70	26 s	7514 ± 273
	5	ND	70	1 min 49 s	6122 ± 705
3 min	0	5299 ± 850	-	-	6825 ± 347
	4	ND	70	2 min 46 s	5362 ± 190
	5	ND	70	9 min 11 s	6485 ± 139
5 min	0	6825 ± 347	-	-	6825 ± 347
	3	6470 ± 356	70	12 s	7917 ± 712
	4	387 ± 58	70	44 s	6683 ± 240
	5	ND	70	4 min 42 s	6912 ± 178

6. CONTRIBUTION PERSONNELLE DE L'ÉTUDIANT

Suite aux échanges avec ses promoteurs, l'étudiant a mis en place le plan expérimental.

L'étudiant a établi les protocoles de microfluidisation, de traitement thermique et relatif à la matière première sur base de la littérature, du matériel disponible et d'essais préliminaires.

L'ensemble des essais pilotes et des analyses ont été réalisés par l'étudiant. L'organisation des expérimentations et le matériel nécessaire ont été gérés par l'étudiant.

La compilation et le traitement des données ont été effectués par l'étudiant au cours du travail permettant d'ajuster le plan expérimental avec les résultats obtenus.

7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude de la combinaison de l'effet mécanique et thermique de la microfluidisation était l'objectif principal de ce travail. L'impact du traitement a été étudié sur la charge microbienne du lait et de deux enzymes, la phosphatase alcaline et la lactoperoxydase. Afin d'atteindre cet objectif, plusieurs étapes ont été réalisées.

Pour commencer, la matière première, le lait cru a été maturé et congelé. La maturation a permis d'augmenter la charge microbienne du produit pour une meilleure observation de la réduction de la flore totale. De son côté, la congélation a permis d'utiliser un lait du même lot durant l'ensemble des expérimentations. Ensuite, la décongélation lente a induit une augmentation supplémentaire de la charge microbienne. Afin de limiter le développement de microorganismes, le protocole de congélation et décongélation peut être amélioré. D'une part, le volume des récipients congelés devrait être réduit. D'autre part, une agitation du récipient devrait être envisagée.

Par la suite, l'effet mécanique de la microfluidisation a été étudié. Les résultats obtenus montrent une destruction cellulaire grâce à l'effet de cisaillement. Cependant, les réductions sont inférieures à un facteur 10 et en dessous de celles obtenues dans la littérature pour des jus de fruits. Par contre, l'étude de traitements thermiques équivalents à ceux générés lors de la microfluidisation montre que l'effet thermique a une bonne efficacité, qui reste inférieure à la combinaison des deux effets.

Par conséquent, la combinaison des deux effets présente des résultats intéressants. Plusieurs facteurs influencent l'efficacité du traitement. Tout d'abord, le nombre de passages augmente la destruction des microorganismes et la température atteinte à la sortie. Ensuite, l'augmentation des températures d'entrées entraîne une sensibilité accrue des parois des microorganismes face au traitement. Par contre, aucun effet significatif d'un temps de repos à la température atteinte après la microfluidisation n'a été établi.

En outre, l'ensemble des essais réalisés montrent que la température atteinte par le lait définit grandement la réduction des microorganismes par le traitement de microfluidisation. C'est pourquoi une meilleure maîtrise de l'échauffement doit être acquise afin de valider des procédés de pasteurisation sûrs. De plus, l'évaluation de la contamination endogène a mis en avant une contamination par le protocole. Malgré tout, la majorité des résultats sont valables excepté les dénombrements de faibles charges microbiennes qui peuvent être surestimés. Afin de réduire cette contamination, un protocole de désinfection strict du matériel peut être établi. Néanmoins, le travail en condition stérile est difficilement réalisable dans les conditions pilotes.

Ensuite, la combinaison des effets de la microfluidisation a un effet sur la phosphatase alcaline. L'activité de l'enzyme a été réduite à partir du 3^e passage, cependant, la majorité de la réduction de l'activité observée concerne l'effet thermique. De son côté, l'activité de la lactoperoxydase a été réduite à partir du 4^e passage avec une température de sortie supérieure à 60 °C. La comparaison avec les traitements thermiques a établi que l'effet mécanique de la microfluidisation est responsable de la réduction de l'activité. Cependant, cette inactivation n'est pas bénéfique pour le lait puisque la lactoperoxydase a un effet antimicrobien. Pour aller plus loin, l'effet de la microfluidisation sur des enzymes contribuant à la détérioration du lait comme les lipases serait intéressant à étudier notamment afin de réduire la détérioration des laits micro filtré par ces enzymes.

Pour conclure, les barèmes de pasteurisation définis par le Codex Alimentarius ont été atteints avec la combinaison des deux effets. À partir de 3 passages, la réduction recommandée de 5 log₁₀ minimum a été atteinte dans les essais dont la courbe de température était plus élevée. Pour un développement à grande échelle, un procédé de 3 passages à 150 MPa est le traitement le plus adéquat. En effet, un nombre de passages plus important est difficilement réalisable à l'échelle industrielle. De plus, dans ce cas l'activité antimicrobienne de la lactoperoxydase est conservée. Une validation des expérimentations effectuées sur du lait frais a montré que le traitement est efficace. Toutefois, des expérimentations supplémentaires avec les microorganismes de références et un contrôle strict de la température sont nécessaires afin de garantir la sûreté sanitaire du procédé établi.

De plus, le traitement de microfluidisation diminue l'impact du traitement thermique sur la qualité nutritionnelle et organoleptique du lait par rapport aux procédés thermiques standards. Dans ce cadre, des analyses sur la vitamine A et les réactions de Maillard, responsable du jaunissement du lait, ont été commandées, mais les résultats ne sont pas encore disponibles. L'étude de ces paramètres sera intéressante pour déterminer les avantages de la microfluidisation sur ces autres paramètres de qualités. Pour finir, une évaluation des besoins énergétiques du traitement de microfluidisation devrait être menée afin de déterminer si ce nouveau procédé permet de réduire la demande énergétique par rapport à un traitement thermique classique.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Biondi, L., Fulgione, A., Capuano, F., Nappa, M., Citro, A., & Nava, D. (2021). Impact of Freezing on the Microbiological Quality and Physical Characteristics of Buffalo Mozzarella Cheese. *Animals*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ani11123502>
- Bucci, A. J., Van Hekken, D. L., Tunick, M. H., Renye, J. A., & Tomasula, P. M. (2018). The effects of microfluidization on the physical, microbial, chemical, and coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6990-7001. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13907>
- Champion, D., Blond, G., Le Meste, M., & Simatos, D. (2000). Reaction Rate Modeling in Cryoconcentrated Solutions : Alkaline Phosphatase Catalyzed DNPP Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4942-4947. <https://doi.org/10.1021/jf000457s>
- Chen, L., Daniel, R. M., & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00171-1)
- Ciron, Chr. I. E., Gee, V. L., Kelly, A. L., & Auty, M. A. E. (2012). Modifying the microstructure of low-fat yoghurt by microfluidisation of milk at different pressures to enhance rheological and sensory properties. *Food Chemistry*, 130(3), 510-519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.056>
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., & Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption : Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>
- Codex Alimentarius. (2009). *CODE OF HYGIENIC PRACTICE FOR MILK AND MILK PRODUCTS, CAC/RCP 57–2004 (Amended 2009)*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>
- Comité du lait (CDL). (2023). *Rapport d'activité 2022* [Rapport d'activité]. <http://www.comitedulait.be/index.php/document>
- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., & Kelly, A. L. (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*, 72(4), 393-399. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001056>
- de Garnica, M. L., Santos, J. A., & Gonzalo, C. (2011). Short communication : Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1922-1927. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3787>
- de Oliveira, G. B., Favarin, L., Luchese, R. H., & McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk : How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 313-321. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220130963>
- Dong, P., Zhou, B., Zou, H., Wang, Y., Liao, X., Hu, X., & Zhang, Y. (2021). High pressure homogenization inactivation of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in phosphate buffered saline, milk and apple juice. *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 159-167. <https://doi.org/10.1111/lam.13487>

- Donsì, F., Ferrari, G., Lenza, E., & Maresca, P. (2009). Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation. *Chemical Engineering Science*, 64(3), 520-532. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.10.002>
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., & Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>
- Dumitraşcu, L., Stănciuc, N., Stanciu, S., & Râpeanu, G. (2012). Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study. *Journal of Food Engineering*, 113(1), 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.028>
- EFSA, (European Food Safety Authority), Clawin-Rädecker, I., De Block, J., Egger, L., Willis, C., Da Silva Felicio, M. T., & Messens, W. (2021). The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. *EFSA Journal*, 19(4), e06576. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6576>
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., & Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26(2), 228-231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.09.005>
- Commission Regulation (EC) No 1664/2006, § Official Journal of the European Union (2006). <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1664/oj>
- Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin, 139 OJ L (2004). <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj/eng>
- Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., & Martin, J. H. (1997). Effects of Microfluidizer® Technology on *Bacillus licheniformis* Spores in Ice Cream Mix1. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2184-2187. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76166-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76166-6)
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843-853. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2003.11.017>
- Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *International Dairy Journal*, 16(6), 500-516. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.013>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.008>
- Fricker, M., Skånseng, B., Rudi, K., Stessl, B., & Ehling-Schulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S24-S30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025>

- Friend, B. A., Shahani, K. M., Long, C. A., & Vaughn, L. A. (1983). The Effect of Processing and Storage on Key Enzymes, B Vitamins, and Lipids of Mature Human Milk I. Evaluation of Fresh Samples and Effects of Freezing and Frozen Storage. *Pediatric Research*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1203/00006450-198301000-00012>
- Goffin, L. (2021). *Etude de l'impact de la microfluidisation sur la qualité microbiologique du lait cru* [Mémoire, Université de Liège]. <https://matheo.uliege.be/handle/2268.2/13240>
- Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25-33. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000524>
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 297-305. <https://doi.org/10.1017/S0022029903006320>
- Hubáčková, M., & Ryšánek, D. (2007). Effects of Freezing Milk Samples on the Recovery of Alimentary Pathogens and Indicator Microorganisms. *Acta Veterinaria Brno*, 76(2), 301-307. <https://doi.org/10.2754/avb200776020301>
- Jo, Y., Benoist, D. M., Barbano, D. M., & Drake, M. A. (2018). Flavor and flavor chemistry differences among milks processed by high-temperature, short-time pasteurization or ultra-pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3812-3828. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14071>
- Johnson, M. E. (2013). Mesophilic and Thermophilic Cultures Used in Traditional Cheesemaking. *Microbiology Spectrum*, 1(1), 10.1128/microbiolspec.cm-0004-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.cm-0004-2012>
- Klotz, V., Hill, A., Warriner, K., Griffiths, M., & Odumeru, J. (2008). Assessment of the Colorimetric and Fluorometric Assays for Alkaline Phosphatase Activity in Cow's, Goat's, and Sheep's Milk. *Journal of Food Protection*, 71(9), 1884-1888. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1884>
- Kohli, G., Jain, G., Bisht, A., Upadhyay, A., Kumar, A., & Dabir, S. (2019). Effect of non-thermal hurdles in shelf life enhancement of sugarcane juice. *LWT*, 112, 108233. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.131>
- Koley, T. K., Nishad, J., Kaur, C., Su, Y., Sethi, S., Saha, S., Sen, S., & Bhatt, B. P. (2020). Effect of high-pressure microfluidization on nutritional quality of carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2159-2168. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04251-6>
- Kumar, A., Dhiman, A., Suhag, R., Sehrawat, R., Upadhyay, A., & McClements, D. J. (2022). Comprehensive review on potential applications of microfluidization in food processing. *Food Science and Biotechnology*, 31(1), 17-36. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-01010-x>
- Kussendrager, K. D., & Hooijdonk, A. C. M. van. (2000). Lactoperoxidase : Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 19-25. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002208>
- Liu, M., Wang, R., Li, J., Zhang, L., Zhang, J., Zong, W., & Mo, W. (2021). Dynamic high pressure microfluidization (DHPM): Physicochemical properties, nutritional constituents and microorganisms of yam juice. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(3), 217-225. <https://doi.org/10.17221/284/2020-CJFS>

- Liu, W., Liu, J., Liu, C., Zhong, Y., Liu, W., & Wan, J. (2009). Activation and conformational changes of mushroom polyphenoloxidase by high pressure microfluidization treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.009>
- Lorenzen, P. C., Clawin-Rädecker, I., Einhoff, K., Hammer, P., Hartmann, R., Hoffmann, W., Martin, D., Molkentin, J., Walte, H. G., & Devrese, M. (2011). A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 166-178. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00656.x>
- Lorenzen, P. Chr., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., & Knappstein, K. (2010). Activities of alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89(1), 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.013>
- Marín, E., Sánchez, L., Pérez, M. d., Puyol, P., & Calvo, M. (2003). Effect of Heat Treatment on Bovine Lactoperoxidase Activity in Skim Milk: Kinetic and Thermodynamic Analysis. *Journal of Food Science*, 68(1), 89-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14120.x>
- Mercan, E., Sert, D., & Akin, N. (2018). Effect of high-pressure homogenisation on viscosity, particle size and microbiological characteristics of skim and whole milk concentrates. *International Dairy Journal*, 87, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.017>
- Mert, I. D. (2020). The applications of microfluidization in cereals and cereal-based products: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(6), 1007-1024. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1555134>
- Microfluidics. (2010). *Taux élevés de désintégration cellulaire et rendement en protéines à l'aide du processeur Microfluidizer® (TB-CD-1)*. <http://www.microfluidics.fr/wp-content/uploads/2017/02/French-Translation-Cell-Disruption-Brochure.pdf>
- Microfluidics. (2014). *Innovation Through Microfluidizer™ Processor Technology—Chamber User Guide*. <https://www.alfatest.it/keyportal/uploads/2017-microfluidics-chamber-user-guide.pdf>
- OCDE/FAO. (2023). *Perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO* [jeu de données]. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/agr-outl-data-fr>
- Parente, E., Ricciardi, A., & Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *International Dairy Journal*, 107, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>
- Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2016). Applications of High and Ultra High Pressure Homogenization for Food Safety. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01132>
- Pearce, L. E., Smythe, B. W., Crawford, R. A., Oakley, E., Hathaway, S. C., & Shepherd, J. M. (2012). Pasteurization of milk: The heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 20-35. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4556>
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1081-1093. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71595-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3)

- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2009). Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1974-1979. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.010>
- Perrier-Cornet, J. M., Marie, P., & Gervais, P. (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.008>
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., & Dumay, E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 454-463. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001853>
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Stanton, C., & Cotter, P. D. (2013). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4928-4937. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6688>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., & Lopez-Hernandez, A. (2010). Invited review : The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5538-5551. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3400>
- Ruiz-Espinosa, H., Amador-Espejo, G. G., Barcenas-Pozos, M. E., Angulo-Guerrero, J. O., Garcia, H. S., & Welti-Chanes, J. (2013). Multiple-pass high-pressure homogenization of milk for the development of pasteurization-like processing conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 56(2), 142-148. <https://doi.org/10.1111/lam.12027>
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., & Ulrich, J. (2004). High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. *Chemical Engineering & Technology*, 27(4), 361-368. <https://doi.org/10.1002/ceat.200406111>
- Seifu, E., Buys, E. M., & Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 16(4), 137-154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.11.002>
- Singh, A. K., Singh, N., Sharma, S., Singh, S. B., Kaur, P., Bhushan, A., Srinivasan, A., & Singh, T. P. (2008). Crystal Structure of Lactoperoxidase at 2.4 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 1060-1075. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.012>
- Singh, S. V., Singh, R., Verma, K., Kamble, M. G., Tarafdar, A., Chinchkar, A. V., Pandey, A. K., Sharma, M., Kumar Gupta, V., Sridhar, K., & Kumar, S. (2022). Effect of microfluidization on quality characteristics of sapodilla (*Manilkara achras* L.) juice. *Food Research International*, 162, 112089. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112089>
- Singhal, S., Baker, R. D., & Baker, S. S. (2017). A Comparison of the Nutritional Value of Cow's Milk and Nondairy Beverages. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(5), 799. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001380>

- Tarafdar, A., Kumar, Y., Kaur, B. P., & Badgujar, P. C. (2021). High-pressure microfluidization of sugarcane juice : Effect on total phenols, total flavonoids, antioxidant activity, and microbiological quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(5), e15428. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15428>
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, *13*(6), 427-439. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00051-7)
- Tribst, A. A. L., Falcade, L. T. P., & de Oliveira, M. M. (2019). Strategies for raw sheep milk storage in smallholdings: Effect of freezing or long-term refrigerated storage on microbial growth. *Journal of Dairy Science*, *102*(6), 4960-4971. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15715>
- Van Brandt, L., Van der Plancken, I., De Block, J., Vlaemynck, G., Van Coillie, E., Herman, L., & Hendrickx, M. (2011). Adequacy of current pasteurization standards to inactivate *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and phosphate buffer. *International Dairy Journal*, *21*(5), 295-304. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.014>
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, *50*, 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>
- von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., & Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, *211*, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Wendorff, W. L. (2001). Freezing Qualities of Raw Ovine Milk for Further Processing. *Journal of Dairy Science*, *84*, E74-E78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70200-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70200-7)
- Wilińska, A., Bryjak, J., Illeová, V., & Polakovič, M. (2007). Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *International Dairy Journal*, *17*(6), 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.008>
- Wittwer, M., Hammer, P., Runge, M., Valentin-Weigand, P., Neubauer, H., Henning, K., & Mertens-Scholz, K. (2022). Inactivation Kinetics of *Coxiella burnetii* During High-Temperature Short-Time Pasteurization of Milk. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.753871>

9. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une valve de haute pression en Y (Dumay et al., 2013)	7
Figure 2 : Chambre d'impact en « Z » (Microfluidics, 2010)	8
Figure 3 : Établissement de la courbe de température théorique moyenne d'un échantillon de lait pendant le traitement de microfluidisation.....	15
Figure 4 : Évolution de la charge microbienne du lait décongelé exprimé en \log_{10} ufc/ml.....	19
Figure 5 : Évolution de la réduction de la charge microbienne et de la température en fonction du nombre de passage au Microfluidizer®. (Essais P06 et P09)	21
Figure 6 : Évolution de la température pendant la microfluidisation en fonction du nombre de passages.....	23
Figure 7 : Réduction logarithmique en fonction du nombre de passages avec des temps de repos différents.....	26
Figure 8 : Évolution de la réduction microbienne et de la température en fonction du nombre de passages avec un lait frais (Essai P17)	28
Figure 9 : Évolution de l'activité de la phosphatase alcaline après microfluidisation	31
Figure 10 : Évolution de l'activité de la lactoperoxydase après microfluidisation	33

10. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des essais pilotes de microfluidisation.....	14
Tableau 2 : Liste des essais pilotes de traitements thermiques.....	16
Tableau 3 : Charge microbienne du lait cru frais, mûri et décongelé en \log_{10}	18
Tableau 4 : Analyses microbiologiques après microfluidisation (Essais P06 et P09).....	20
Tableau 5 : Analyses microbiologiques après microfluidisation avec refroidissement immédiat (Essai P16).....	22
Tableau 6 : Évolution de la température au cours de la microfluidisation en fonction du nombre de passages. Valeurs exprimées en degrés Celsius.....	23
Tableau 7 : Comparaison de la réduction de la charge microbienne mésophile entre la microfluidisation et le traitement thermique.	24
Tableau 8 : Évaluation de la contamination endogène du matériel utilisé	25
Tableau 9 : Évolution de la température durant le temps de repos (Essai P11)	27
Tableau 10 : Analyses microbiologiques de l'impact de la microfluidisation sur un lait cru frais. (Essai P17).....	27
Tableau 11 : Activités de la phosphatase alcaline (μg de phénol/ml) après microfluidisation. 30	
Tableau 12 : Activités de la phosphatase alcaline (μg de phénol/ml) après microfluidisation et traitement thermique	32
Tableau 13 : Activités de la lactoperoxydase (U/l) après microfluidisation.....	32
Tableau 14 : Activités de la lactoperoxydase (U/l) après microfluidisation et traitement thermique.....	34