LA FLORE MICROBIENNE DU CAMEMBERT ET SON ÉVOLUTION AU COURS DE LA MATURATION (1)

par

J. LENOIR

Laboratoire de Technologie

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon

Une fois établi par DUCLAUX [1] le rôle primordial des micro-organismes dans le processus de maturation, de nombreux chercheurs se sont, à la suite de MAZÉ [2], de FREUDENREICH [3] et ORLA-JENSEN [4], intéressés à la microbiologie fromagère. Cependant, la plupart des travaux, surtout les plus récents, ont été consacrés à des fromages étrangers tels le Cheddar, le Tilsitt ou le Brick et les études relatives aux fromages fabriqués en France restent à ce jour assez peu nombreuses.

En ce qui concerne les fromages à pâte molle du type Camembert on a, notamment depuis les travaux de MAZÉ [2] et de F. SANSONETTI [5], une connaissance assez précise des microflores superficielles successives. Très rapidement après égouttage, alors que le caillé acide est essentiellement peuplé de ferments lactiques, la surface du fromage se couvre d'une flore acidophile spontanée où les levures du genre *Torula* dominant [6] ; peu à peu, *Geotrichum candidum* se développe et, après 5 à 7 jours, les filaments mycéliens de *Penicillium caseicolum* ensemencé apparaissent et forment à la surface du fromage un feutrage blanc. Ces moisissures consomment l'acide lactique, désacidifient la pâte et, ainsi, permettent le développement d'une dernière microflore superficielle constituée essentiellement de *Bacterium linens* et de divers microcoques [7]. Si l'évolution de la flore de surface est bien connue, celle de la flore interne l'est beaucoup moins. En outre, l'importance relative des divers groupes microbiens à différents stades de la maturation reste encore imprécise ; or, ce point nous paraît non négligeable, si l'on veut déterminer la part qui revient à chacun de ces groupes dans le processus de maturation, en particulier dans la dégradation des matières azotées.

Dans une note antérieure [8] nous avons suivi, sur plusieurs séries de Camemberts normands (2), la dégradation des protides en surface et à l'intérieur du fromage au cours de la maturation. Nous avons observé de nettes différences dans l'évolution et la composition des matières azotées de ces deux parties. Ces différences s'expliquent, au moins partiellement, par la présence en surface des

(1) *C. R. Acad. Agr.* 1962, **48**, n° 8, 392.

(2) Coopérative laitière d'Isigny (Calvados).

moisissures qui, non seulement désacidifient le caillé, et ainsi, favorisent l'action des enzymes protéolytiques [9], [10], mais encore, secrètent de telles enzymes [11]. Toutefois, il nous a paru intéressant de préciser, qu'en dehors des moisissures, la surface et l'intérieur du fromage se différencient par la composition et l'évolution de leur microflore et de rechercher dans quelle mesure ces différences de peuplement peuvent expliquer les caractères distinctifs de la protéolyse.

Dans ce but, nous avons procédé sur quatre séries de fromages, provenant chacune de la même fabrication, à une détermination des fractions azotées et de certaines caractéristiques de la pâte : *pH*, teneurs en eau, en sel, en matière grasse [8] et à une analyse microbiologique. Après séparation de la surface et de l'intérieur du fromage puis homogénéisation au mortier des deux parties, 10 g de chacune d'elles sont dissous dans 90 ml de solution stérile de citrate de soude à 2 p. 100 portés à la température de 45°C [12]. Après dilution convenable dans une solution de RINGER au 1-4 les dénombrements suivants sont effectués par ensemencement en boîte de Pétri.

- microflore totale sur gélose nutritive (1) ;
- streptocoques lactiques sur gélose nutritive (1) additionnée de 0,5 p. 1 000 d'acétate de thallium [13] ;
- levures sur malt gélosé à *pH* 3,5 (Difco B 24) ;
- bactéries coliformes sur gélose au désoxycholate (Difco B 420) ;
- microcoques et bactéries halophiles sur milieu de Chapman [14].

Les résultats de l'analyse chimique ont permis de constater que, d'une série à l'autre, pour des prises d'essai de même origine, surface ou intérieur, les facteurs susceptibles d'influencer l'activité microbienne, *pH*, teneur en eau, teneur en sel, subissent des variations de faible amplitude ou évoluent de manière à peu près constante au cours de la maturation ; comme, d'autre part, la protéolyse résultant de cette activité présente une certaine constance, il est vraisemblable que l'évolution de la microflore est sensiblement identique dans chacune des séries.

A titre d'exemple, les figures 1 et 2 représentent les variations, d'une série à l'autre, des nombres de germes totaux, de streptocoques lactiques, de levures et de microcoques qui peuplent la surface du fromage au cours de l'affinage. Les nombres de germes

(1) *Formule du Milieu* : Extrait de viande (Difco) : 5 g. Extrait de levure (Difco) : 3 g. Bacto tryptone (Difco) : 10 g. Glucose : 5 g. Gélose : 15 g. Eau distillée Q.S.P. 1 000 ml. *pH* final : 7,1-7,2.

Fig. 1. — Evolution des germes totaux (points) et des microcoques (traits) au cours de la maturation du camembert : Surface.

Variation d'une série à l'autre : série 1 + +, série 2 ●●, série 3 ○○, série 4 × ×.

totaux et de streptocoques lactiques varient peu d'une série à l'autre ; par contre, ceux de levures et de microcoques sont nettement plus dispersés, mais leur évolution dans le temps présente une certaine analogie. Des dispersions du même ordre sont observées sur la microflore de l'intérieur du fromage. Ainsi, une première constatation peut être faite : les nombres de germes microbiens vivants évoluent de manière comparable dans les différentes séries et, pour les prises d'essais de même origine, prélevées au même stade de maturation, la composition de la flore n'est guère différente. Cependant, une exception est relevée ; elle concerne les bactéries coliformes dont le nombre varie d'une fabrication à l'autre dans des proportions importantes.

Si l'on compare les microflores superficielle et interne (tableau I) on remarque que les nombres de germes totaux et de streptocoques lactiques sont peu différents mais que les microcoques et les levures

Fig. 2. — Evolution des ferments lactiques (points) et des levures (traits) au cours de la maturation du camembert : Surface.

Variation d'une série à l'autre : série 1 + +, série 2 ●●, série 3 ○○, série 4 × ×.

TABLEAU I

MICROFLORES SUPERFICIELLE ET INTERNE DU CAMEMBERT
AUX DIVERS STADES DE MATURATION

(Teneurs moyennes par gramme (en millions de germes))

Jours		3-5	6-9	10-13	17-21	24-27	30-3
Germes totaux ...	Surface	1 400	1 400	1 300	1 600	2 000	2 300
	Intérieur	1 800	1 200	700	700	900	1 000
Strepto- coques lac- tiques	Surface	1 000	1 100	900	1 000	1 100	900
	Intérieur	1 800	800	600	600	700	700
Microcoques et bactéries halophiles.	Surface	1	15	40	300	500	800
	Intérieur	1	0,7	0,5	0,6	0,6	1
Levures	Surface	5	50	100	50	50	50
	Intérieur	0,05	0,5	0,4	0,5	0,4	0,6
Bactéries coliformes	Surface	0,01	0,1	0,1-1	1	1	1
	Intérieur	0,01-0,1	0,1	0,01-0,1	0,1	0,01-0,1	0,01-1

Fig. 3. — Evolution de la flore microbienne au cours de la maturation du camembert : Surface. 1 : germes totaux, 2 : ferments lactiques, 3 : microcoques, 4 : levures.

sont nettement plus abondants en surface, et cela, à tous les stades de la maturation. Surface et intérieur du fromage apparaissent également distincts si on envisage l'évolution de la flore microbienne au cours de l'affinage (fig. 3 et 4).

La population microbienne totale de la surface et celle de l'intérieur sont voisines de 10^9 par g de fromage tout au long de la maturation. Au début, les nombres de germes présents en surface et à l'intérieur sont sensiblement égaux. Après une dizaine de jours la microflore superficielle est un peu plus riche, cette légère différence résulte du fait que la flore superficielle tend à augmenter avec l'âge du fromage alors que la flore interne tend plutôt à diminuer au cours des dix premiers jours d'affinage.

Les streptocoques lactiques représentent la majeure partie de la flore totale aussi bien interne que superficielle. En surface leur nombre reste pratiquement égal à 10^9 du début à la fin de la matu-

Fig. 4. — Evolution de la flore microbienne au cours de la maturation du camembert : Intérieur. 1 : germes totaux, 2 : ferments lactiques, 3 : microcoques, 4 : levures.

ration. Cependant leur importance relative diminue : s'ils représentent la quasi-totalité de la flore totale dans le caillé ils n'en forment guère que la moitié dans le fromage affiné. A l'intérieur, le nombre de streptocoques lactiques a tendance à diminuer au cours des dix premiers jours. Par la suite ce nombre reste à peu près stationnaire mais, du début à la fin de l'affinage, ces germes représentent les trois quarts au moins de la flore totale.

L'évolution des microcoques est particulièrement caractéristique. En surface leur nombre croît très rapidement, surtout au cours des vingt premiers jours et de 10^6 par gramme au début, il atteint près de 10^9 en fin de maturation. Ainsi, ces micro-organismes, qui ne représentent dans le caillé qu'une infime partie de la

flore superficielle, forment près de 50 p. 100 de celle-ci dans le fromage affiné. A l'intérieur, par contre, le nombre de microcoques reste sensiblement égal à 10^6 à tous les stades de la maturation ; du début à la fin de l'affinage leur proportion par rapport à la flore totale est donc très faible. Ces résultats doivent cependant être interprétés en tenant compte du fait que les dénombrements effectués sur le milieu de Chapman n'intéressent pas uniquement les microcoques. D'autres espèces microbiennes halophiles, en particulier les streptocoques du groupe D et les bactéries du type *Bacterium linens*, peuvent aussi cultiver sur ce milieu. Des isoléments ont effectivement permis de caractériser sur les fromages non affinés la présence d'une proportion importante de streptocoques du groupe D. Par contre, en fin de maturation, seuls des microcoques ont été décelés. Que ce soit au début ou en fin d'affinage aucune bactérie du type *Bacterium linens* n'a été isolée. Il est donc assez vraisemblable que les germes de ce type sont présents en nombre beaucoup plus faible que les microcoques, aussi bien en surface qu'à l'intérieur du fromage.

Caractéristique aussi est l'évolution des levures. En surface, ces micro-organismes sont présents au nombre de $5 \cdot 10^6$ par gramme dès les 3^e et 4^e jours de fabrication. Ils prolifèrent activement jusqu'aux environs du 10^e jour et, à ce stade, leur nombre est voisin de 10^8 ; par la suite, si ce nombre tend à décroître légèrement, il n'en reste pas moins proche de ce maximum jusqu'à la fin de la maturation. A l'intérieur, le nombre de levures est nettement moins élevé, et cela, dès les premiers jours ; il se produit cependant un développement sensible de ces micro-organismes : de $5 \cdot 10^4$ au 4^e jour, leur nombre atteint $5 \cdot 10^5$ aux environs du 7^e jour, puis se maintient à peu près constant par la suite.

Quant aux bactéries coliformes, leur nombre est trop variable d'une série à l'autre, voire même parfois d'un échantillon à l'autre dans une même série, pour permettre de caractériser le type de fromage. Les teneurs moyennes ne sont mentionnées que pour donner l'ordre de grandeur de cette population. Une remarque peut cependant être faite, les bactéries coliformes de la flore superficielle tendent à se développer au cours de la maturation, une telle tendance ne semble guère décelable pour les bactéries coliformes de la flore interne.

Ainsi les microflores superficielle et interne du Camembert sont nettement caractérisées. Outre le feutrage mycélien qui recouvre le fromage au bout d'une huitaine de jours, surface et intérieur se distinguent par leur peuplement en microcoques et en levures et par l'évolution de ce peuplement. Le nombre de levures est en

surface nettement plus élevé qu'à l'intérieur, le rapport de ces nombres reste, du début à la fin de l'affinage, assez peu différent de $\frac{100}{1}$. Les microcoques sont présents en nombres égaux dans les parties superficielle et interne du caillé, mais, comme au cours de l'affinage ils se développent très activement en surface, alors qu'à l'intérieur leur nombre reste à peu près constant, le rapport de ce peuplement atteint de $\frac{1\ 000}{1}$ en fin de maturation. Surface et intérieur du fromage se différencient également, sinon par leur population lactique, du moins par la place que cette population occupe dans la flore microbienne totale. En effet, les streptocoques lactiques représentent la flore dominante du Camembert, aussi bien en surface qu'à l'intérieur, mais alors qu'ils dominent largement la flore interne à tous les stades de la maturation, leur nombre en surface ne dépasse guère celui des autres groupes microbiens en fin d'affinage.

Ces différences dans la composition et l'évolution de la microflore de la surface et de l'intérieur du Camembert ne sont pas sans rapports avec le caractère centripète de la protéolyse. Si la dégradation des prodides est plus rapide et plus profonde à la partie superficielle du fromage, plusieurs facteurs en sont cause : outre qu'en surface l'évolution du pH est plus favorable à l'action des enzymes protéolytiques et la sécrétion des protéinases d'origine fongique plus active, la présence en nombre élevé de microcoques et de levures n'y est sans doute pas non plus étrangère. Le caractère protéolytique de nombreux microcoques (et de *Bacterium linens*) est en effet bien connu [7, 15, 16]. Bien connue aussi est l'action stimulante des levures sur le développement et l'activité de ces microorganismes [17, 18].

Toutefois pour évaluer la part prise par les divers groupes microbiens dans la dégradation des matières azotées d'un type de fromage il ne suffit pas de mettre en évidence l'importance relative de chacun de ces groupes. Encore faut-il, d'une part, s'assurer que de nombreuses espèces isolées de ce groupe sont effectivement douées d'un pouvoir protéolytique, d'autre part, déterminer la profondeur et la qualité de la protéolyse dont elles sont capables, seules et associées, dans des conditions de milieu comparables à celles qui président à la maturation. Des travaux en cours ont pour objet de préciser ces derniers points.

SUMMARY

The development of the microbic flora during the course of the ripening of the Camembert has been followed, in the interior and on the surface of the cheese, on four series of samples. The superficial and internal microflora are distinguishable notably through the density of yeasts and micrococci and through the growth of these densities. From the beginning to the end of the maturing, the yeasts are clearly more abundant on the surface of the cheese than they are inside. The micrococci are present in equal numbers in the superficial and inside parts of the curds. They develop very actively on the surface during maturation, while inside the paste their number remains practically constant. The presence on the surface of a higher number of micrococci and of yeasts probably helps to quicken and « deepen » the gradual loss of proteins in this part of the cheese.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] DUCLAUX (E.). Principes de laiterie, Paris, 1883.
- [2] MAZE (P.). Technique fromagère. *Ann. Inst. Pasteur*, 1910.
- [3] FREUDENREICH (E. de). *Rev. Gen. du Lait*, 1901-1902.
- [4] ORLA-JENSEN (S.). *Rev. Gen. du Lait*, 1905-1906.
- [5] SANSONETTI (F.). *Le Lait*, 1930, **10**, 627.
- [6] GUITTONNEAU (G.), KEILLING (J.) et DELAVAL (H.). *Le Lait*, 1939, **19**, 1938.
- [7] JACQUET (J.) et STEEG (L.). *C. R. Ac. Sci.*, 1953, **237**, 767.
- [8] LENOIR (J.). *C. R. Ac. Agr.*, 1962, **48**, 160. (*Le Lait*, 1963, N° 423-4, 154).
- [9] BARIBO (L. E.) et FOSTER (E. M.). *J. Dairy Sci.*, 1952, **35**, 149.
- [10] RAADSVELD (C. W.) et MULDER (H.). *Neth. Milk and Dairy J.*, 1949, **3**, 222.
- [11] DOLEZALEK (J.). *Ind. Alim. Agr.*, 1956, **7**, 535.
- [12] HAMMER (B. W.) et BABEL (F. J.). *Dairy Bacteriology*, 4^e édition, New-York, 1957.
- [13] HIRSCH (A.), Mc CLINTOCK (M.) et MOCQUOT (G.). *J. Dairy Res.*, 1952, **19**, 179.
- [14] CHAPMAN. *J. Bact.*, 1945, **50**, 201.
- [15] ALFORD (J. A.) et FRAZIER (W. C.). *J. Dairy Sci.*, 1950, **33**, 115.
- [16] ALBERT (J. O.), LONG (H. F.) et HAMMER (B. W.). *Iowa Agr. Exp. Sta. Research Bull.*, 1944, 328.
- [17] IYA (K. K.) et FRAZIER (W. C.). *J. Dairy Sci.*, 1949, **32**, 475.
- [18] LUBERT (D. J.) et FRAZIER (W. C.). *J. Dairy Sci.*, 1955, **38**, 981.