LA FLORE MICROBIENNE DU FROMAGE DE ROQUEFORT

I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage

par

J. J. DEVOYOD, G. BRET et J. E. AUCLAIR

*Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie
des Produits Animaux, I.N.R.A., Jouy-en-Josas (Yvelines)
Laboratoire de la Société des Cavés et des Etablissements Rigal,
Roquefort (Aveyron)*

Introduction

Lors d'une étude précédente (Devoyod & Bret, 1966) nous avons suivi au cours d'une fabrication traditionnelle de fromage de Roquefort, les variations du nombre des principaux organismes qui constituent, tant en surface qu'en profondeur, la flore du fromage. Nous avons constaté qu'il existait du point de vue de la flore microbienne, trois étapes importantes au cours de la fabrication du fromage : une période qui s'étend depuis l'emprésurage jusqu'au début du salage et que nous appelons « fabrication avant salage », une période qui s'étend depuis le début du salage jusqu'au moment où les fromages sont mis sous feuille d'étain et que nous appelons « premier affinage », enfin une dernière période qui s'étend jusqu'à la commercialisation des fromages et que nous dénommons « deuxième affinage ».

Dans ce type de fromage, *Penicillium roqueforti* joue évidemment, au cours de l'affinage, un rôle essentiel dans le développement de l'arôme caractéristique du fromage. Les conditions de son développement et son activité enzymatique ont déjà fait l'objet de nombreuses recherches.

Cependant, le fromage de Roquefort contient, en plus de la moisissure bleue, une flore microbienne très variée dont l'influence sur les qualités organoleptiques du fromage est probablement loin d'être négligeable.

C'est la raison pour laquelle il nous a paru intéressant d'étudier, au cours des trois étapes précédemment définies, le développement de la flore microbienne, autre que celle constituée par *P. roqueforti*, et de préciser l'influence du salage sur le développement de cette flore.

Matériel et méthodes

Fabrication et affinage.

Nous avons étudié deux fabrications traditionnelles de fromage de Roquefort : l'une effectuée dans une petite laiterie qui traite 120 000 litres de lait par saison (laiterie A), l'autre faite dans une laiterie plus importante qui traite 800 000 litres de lait par saison (laiterie B).

L'emprésurage du lait, le travail du caillé, la mise en moules, le salage et l'affinage étaient réalisés selon les méthodes traditionnelles en usage à Roquefort, méthodes décrites par Mocquot & Bejambes (1960). 174 jours se sont écoulés entre l'emprésurage du lait et la commercialisation des fromages, se répartissant ainsi : « fabrication avant salage » : 10 jours ; « premier affinage » : 24 jours et « deuxième affinage » : 140 jours.

Echantillons.

Un échantillon de lait a été prélevé, dans chaque laiterie, juste avant l'emprésurage.

Des échantillons de fromage ont été prélevés aux différents stades de la fabrication et de l'affinage suivant le schéma indiqué dans le tableau I. On prélevait, chaque fois sur un fromage différent, provenant d'une même fabrication, trois échantillons : deux échantillons de la surface du fromage, par grattage de chacune des faces, et un échantillon au centre du fromage, à l'aide d'une sonde.

Examen bactériologique du lait.

Des dilutions décimales des échantillons de lait étaient faites à l'aide de solution de Ringer au 1/4. Les germes totaux étaient dénombrés sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 (concentration finale) ; les bactéries coliformes sur gélose au désoxycholate de sodium (Desoxycholate Agar Difco n° 420) ; les levures sur gélose à l'extrait de pomme de terre (Potato Dextrose Agar Difco n° 13) ajustée à pH 3,5 avec de l'acide tartrique ; les staphylocoques et les microcoques sur milieu de Chapman (Mannitol Salt Agar Difco n° 30).

Examen bactériologique du fromage.

1 g de fromage, additionné d'environ 0,1 g de citrate trisodique stérile, était broyé dans un mortier et dilué avec 9 ml de solution stérile de Ringer au 1/4. Des dilutions décimales étaient faites ensuite dans la même solution de Ringer au 1/4. Le dénombrement des germes totaux, des bactéries coliformes, des levures, des staphylocoques et des microcoques était effectué sur les milieux cités

TABLEAU I

SCHEMA DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE FROMAGE

Nombre de jours après l'emprésurage		Stades de la fabrication		Prélèvement d'échantillons	
o		Emprésurage		Laiterie A	Laiterie B
1 ^{re} semaine	1	Salle chaude 18° C	« Fabrication avant salage »	+	+
	2			+	
	3	Salle froide 10° C		+	+
	4			+	
	5			+	+
	6			+	
	7			+	
2 ^e semaine	8	Début du salage			
	9				
	10			+	+
	11				
	12				
	13				
	14				
3 ^e semaine	15	Fin du salage		+	+
	16				
	17				
	18				
	19		« 1 ^{er} affinage »	+	+
	20				
	21				
4 ^e semaine	22			+	+
	23				
	24				
	25			+	+
	26				
	27				
	28			+	+
5 ^e semaine	29	Mise sous feuille d'étain (« plombage »)			
	30			+	+
	31				
	32				
	33			+	+
	34				
	35				
6 ^e semaine			« 2 ^e affinage »	+	+
7 ^e semaine				+	+
8 ^e semaine				+	+
9 ^e semaine				+	+
10 ^e semaine				+	+
11 ^e semaine					
12 ^e semaine				+	+
13 ^e semaine					
14 ^e semaine				+	+
15 ^e semaine					
16 ^e semaine				+	+
17 ^e semaine					
18 ^e semaine					
19 ^e semaine				+	+
20 ^e semaine					
21 ^e semaine					
22 ^e semaine				+	+
23 ^e semaine					
24 ^e semaine					
25 ^e semaine		Commercialisation		+	+

ci-dessus. Les staphylocoques coagulase-positifs étaient dénombrés sur milieu ETGPA (Baird-Parker, 1962).

Analyses chimiques.

Les mesures et analyses suivantes ont été effectuées sur les échantillons de fromage prélevés au cours du premier et du deuxième affinages : mesure électrométrique du pH, détermination de l'extrait sec, dosage des chlorures et de l'acide lactique, de l'azote total et de l'azote soluble. Les méthodes utilisées ont été indiquées précédemment (Devoyod & Bret, 1966).

Résultats

Fabrication avant salage.

Le résultat des numérations effectuées sur le lait juste avant l'emprésurage est donné dans le tableau II. On voit que le lait cru de brebis est, en général, fortementensemencé ; en plus des bactéries lactiques, la teneur du lait en bactéries coliformes, staphylocoques et microcoques est importante.

TABLEAU II
FLORE MICROBIENNE DU LAIT AVANT EMPRÉSURAGE
(Nombre de germes par ml de lait)

	<i>Flore totale</i>	<i>Bactéries coliformes</i>	<i>Levures</i>	<i>Microcoques et Staphylocoques</i>
Laiterie A	$1,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^5$	$6,8 \times 10^2$	$7,8 \times 10^5$
Laiterie B	$3,2 \times 10^8$	$8,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$

Les figures 1 et 2 montrent les variations de la flore microbienne à la surface et au centre du fromage avant salage, c'est-à-dire au cours des 10 premiers jours de la fabrication. Pour les échantillons prélevés à la surface du fromage, les chiffres qui ont servi à établir les graphiques correspondent à la moyenne des numérations effectuées sur chaque face des fromages.

Le nombre des germes totaux varie peu au cours de cette période, à la surface, comme au centre du fromage. Dans le cas de la laiterie B, la flore dominante, 24 heures après l'emprésurage, est constituée uniquement de microorganismes acidifiants, ainsi que le montrait le changement de coloration de l'indicateur de pH autour des colonies qui s'étaient développées sur gélose nutritive. Ces microorganismes ont été identifiés comme étant des strepto-

Fig. 1. — Evolution de la flore microbienne à la surface du fromage de Roquefort avant salage.

coques lactiques (Devoyod & al., 1969). Par contre, dans le cas des échantillons provenant de la laiterie A, la flore dominante était constituée à la fois de microorganismes non acidifiants et de microorganismes acidifiants. Ces derniers devenaient prédominants par la suite.

Dans le cas des deux laiteries, le nombre des levures augmente très nettement pendant les 24 premières heures de la fabrication (10^2 dans le lait, 10^5 à 10^6 dans le fromage de 24 heures). Cette augmentation continue régulièrement pendant les 10 premiers jours qui suivent l'emprésurage.

Fig. 2. — Evolution de la flore microbienne au centre du fromage de Roquefort avant salage.

Le nombre des microorganismes qui se développent sur milieu de Chapman varie peu à la surface du fromage (fig. 1) tandis qu'au centre (fig. 2) il diminue légèrement. L'acidification du milieu, la température de la salle froide (10° C) ne créent pas des conditions favorables au développement de ces germes.

Dans les deux laiteries A et B, nous constatons, au cours de cette période une diminution nette du nombre des coliformes, due vraisemblablement à l'acidification du fromage.

Les résultats des dénombrements des staphylocoques coagulase-positifs sont donnés dans le tableau III. Nous voyons que ces

staphylocoques disparaissent rapidement pendant les 10 premiers jours de la fabrication, surtout au centre du fromage. On n'en trouve plus après salage.

TABLEAU III

DÉNOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES COAGULASE POSITIFS
A LA SURFACE ET AU CENTRE DU FROMAGE DE ROQUEFORT
(Nombre de germes par g de fromage)

	<i>Laiterie A</i>		<i>Laiterie B</i>	
	<i>Surface</i>	<i>Centre</i>	<i>Surface</i>	<i>Centre</i>
48 h après l'emprésurage ...	150 000	90 000	700 000	120 000
4 jours après l'emprésurage	30 000	3 400	95 000	12 000
10 jours après l'emprésurage (juste avant le salage)	1 100	< 10	11 000	800
16 jours après l'emprésurage (après salage)	< 10	< 10	< 10	< 10

Premier affinage.

C'est, rappelons-le, la période qui s'étend du début du salage à la mise des fromages sous feuille d'étain (« Plombage »).

La figure 3 montre les variations de la flore microbienne à la surface du fromage au cours du « premier affinage ». Le nombre de germes totaux diminue au cours de la période de salage, puis augmente une semaine après la fin du salage. L'évolution des levures est semblable à celle des germes totaux, cependant l'augmentation du nombre des levures se produit immédiatement après la fin du salage. Le nombre des microorganismes dénombrés sur milieu de Chapman augmente légèrement au cours du salage, puis rapidement ensuite.

Ces variations, dans les principaux groupes microbiens, correspondent à une modification qualitative importante de la flore dominante. Immédiatement après le salage, la flore dominante de la surface du fromage est composée de streptocoques lactiques et de streptocoques identifiés par la suite comme étant des entérocoques (Devoyod & Muller, 1969). Une semaine après le salage, cette flore dominante est constituée de levures, de microcoques, de streptocoques lactiques. Ces derniers comprennent à la fois des streptocoques homofermentaires et des streptocoques hétérofermentaires appartenant au genre *Leuconostoc* (Devoyod & al., 1969).

Fig. 3. — Evolution de la flore microbienne à la surface du fromage de Roquefort au cours du premier affinage.

Comme nous l'avions déjà constaté dans une étude précédente (Devoyod & Bret, 1966), les levures qui se multiplient après le salage sont très différentes de celles que l'on rencontre avant le salage. Celles que l'on trouve après le salage sont nettement plus petites que celles que l'on trouve avant le salage, et elles sont capables de se développer lorsque la teneur en chlorure de sodium est supérieure à 10 p. 100. Elles ne forment pas de spores ; cependant

la présence de becs de copulation constatée sur des cultures de 15 jours sur milieu de Fowell (1952), permet de penser qu'il s'agit de levures haplobiontiques hétérothalliques (Galzy, 1967).

Nous avons constaté d'autre part qu'après le salage, la flore microbienne qui se développe sur le milieu de Chapman est constituée uniquement de microcoques (Devoyod, 1969a), alors qu'avant le salage les microorganismes que l'on trouve sur ce même milieu sont presque exclusivement des staphylocoques.

Fig. 4. — Evolution de la flore microbienne au centre du fromage de Roquefort au cours du premier affinage.

La figure 4 montre les variations de la flore microbienne *au centre du fromage* au cours du « premier affinage ». Nous observons d'abord une diminution progressive du nombre des germes totaux, qui augmente légèrement ensuite. A la fin de cette période, au moment de la mise des fromages sous feuille d'étain, la flore dominante, au centre du fromage, est constituée de streptocoques lactiques et de *Leuconostoc*. Le nombre des levures diminue d'abord pendant la période du salage, puis augmente ensuite. L'augmentation des microcoques est progressive et leur nombre reste toujours très inférieur à celui des levures.

Fig. 5. — Teneurs en acide lactique, en chlorure de sodium et valeurs de pH à la surface du fromage de Roquefort au cours du premier affinage.

Les figures 5 et 6 montrent les variations de la teneur en acide lactique, de la teneur en chlorure de sodium et les valeurs de pH respectivement à la surface et au centre du fromage. La teneur en

acide lactique diminue au cours du « premier affinage » et nous constatons que cette diminution est plus rapide dans les fromages de la laiterie B que dans ceux de la laiterie A, surtout pour les échantillons prélevés à la surface du fromage. Au centre du fromage, la diminution de la teneur en acide lactique est surtout nette à partir de la « pousse du bleu », c'est-à-dire lorsqu'on constate l'apparition de *P. roqueforti*, environ une dizaine de jours après le salage.

Fig. 6. — Teneurs en acide lactique, en chlorure de sodium et valeurs de pH au centre du fromage de Roquefort au cours du premier affinage.

- Laiterie A.
- Laiterie B.
- ● Acide lactique.
- ■ Chlorure de sodium.
- △ ▲ pH.
- b Fin du salage.
- c Passage à la piqueuse.

Le pH des fromages augmente en même temps que la teneur en acide lactique diminue. Nous constatons, après le salage, une diminution progressive de la teneur en chlorure de sodium de la partie

salée (surface), et une augmentation progressive de la teneur en chlorure de sodium de la partie non salée (centre).

Fig. 7. — Evolution de la flore microbienne à la surface du fromage de Roquefort au cours du deuxième affinage.

Deuxième affinage.

La figure 7 montre les variations de la flore microbienne totale à la surface du fromage. L'évolution de la flore totale, des levures et des microcoques étant sensiblement la même, nous n'avons, pour la clarté de la figure, représenté que l'évolution de la flore totale. Jusqu'à la septième semaine, nous observons peu de variations du nombre des germes totaux ; leur nombre diminue ensuite légèrement. A ce stade, la flore totale est constituée de microcoques, de levures, de streptocoques lactiques et de streptocoques hétérofermentaires (*Leuconostoc*). A partir de la neuvième semaine, nous avons trouvé, dans les échantillons de fromage de la laiterie A, en plus des microorganismes précédemment cités, des germes fortement protéolytiques du genre *Brevibacterium*.

La figure 8 montre les variations de la flore microbienne au centre du fromage au cours du « deuxième affinage ». Comme en surface, le nombre des germes de la flore totale varie peu au cours de cette période. Cette flore totale est constituée de streptocoques lactiques et de *Leuconostoc* (Devoyod & al., 1969). Le nombre des levures varie peu également. Le nombre des microcoques augmente légèrement au début du « deuxième affinage », puis diminue ensuite.

Les valeurs de pH mesurées à la surface et au centre du fromage (fig. 9) montrent des variations importantes au cours de cette

période. Ce phénomène est vraisemblablement dû à l'hétérogénéité du fromage. Il est possible aussi que, dans un même lot de fromages, il existe des différences d'un fromage à un autre. On peut noter cependant une augmentation générale du pH. Les teneurs en azote soluble (fig. 10) à la surface et au centre du fromage montrent également de grandes variations au cours du « deuxième affinage », les teneurs en azote soluble étant cependant nettement plus élevées en fin d'affinage qu'en début d'affinage.

Fig. 8. — Evolution de la flore microbienne au centre du fromage de Roquefort au cours du deuxième affinage.

Discussion

Aux trois stades importants de la fabrication du fromage de Roquefort, correspondent trois types d'évolution microbienne nettement distincts. Au cours de la « fabrication avant salage », les bactéries lactiques se développent en acidifiant le milieu. Pendant le « premier affinage », nous voyons se développer, à côté de la flore lactique, une flore microbienne résistante au sel, constituée de levures et de microcoques. Au cours du « deuxième affinage »,

Fig. 9. — Variations des valeurs de pH à la surface et au centre du fromage de Roquefort au cours du deuxième affinage.

Fig. 10. — Variations de la teneur en azote soluble à la surface et au centre du fromage de Roquefort.

P. roqueforti, dont le développement avait débuté au stade précédent, donne peu à peu au fromage son caractère typique.

Selon Proks & al. (1959), le rôle essentiel des bactéries lactiques est, dans le fromage bleu, la production d'acide lactique dans le fromage, et ces bactéries pourraient éventuellement, être remplacées par une addition d'acide lactique. Cependant, selon ces mêmes auteurs, les bactéries lactiques ont de plus une légère action stimulante vis-à-vis de la croissance de *P. roqueforti*. Clarke & Golding (1949) ont montré que cette action stimulante varie avec les souches de bactéries lactiques utilisées. Babel (1953) estime même que *Str. lactis* est la seule espèce bactérienne nécessaire dans la fabrication du fromage bleu. A la lumière de nos résultats on peut se demander cependant si, à côté de *Str. lactis*, d'autres espèces microbiennes ne jouent pas un rôle au cours des premiers stades de la fabrication. Pour que *P. roqueforti* puisse se développer au centre du fromage, il est en effet nécessaire que le caillé soit « ouvert ». Au cours d'essais de fabrication de fromages de Roquefort effectués soit à partir de lait cru peuensemencé, soit à partir de lait pasteurisé auquel on ajoutait des cultures de *Str. lactis*, nous avons obtenu des caillés tassés, peu ouverts, dans lesquels le *Penicillium* se développait mal. Or, dans le lait cru de brebis et dans les fromages de 24 heures, nous avons isolé des streptocoques hétérofermentaires, certains types d'entérocoques et de levures susceptibles de produire du gaz, et, par là même, de provoquer « l'ouverture » du caillé. L'étude de ces germes fera l'objet de publications ultérieures.

Le salage des fromages entraîne, principalement en surface, mais aussi au centre du fromage, une modification importante de la flore. Cependant nous avons constaté que les streptocoques lactiques se trouvent toujours en flore dominante, au cours de l'affinage, tant au centre qu'à la surface du fromage de Roquefort. Nos résultats diffèrent nettement de ceux obtenus par Babel (1952). Cet auteur a observé en effet que, dans le fromage bleu, les streptocoques producteurs d'acide disparaissent en grande partie peu après le salage, ou dans les 10 jours qui suivent. Pour expliquer cette divergence, on pourrait penser que des streptocoques lactiques du lait de brebis et du fromage de Roquefort présentent des caractères particuliers. Cependant les streptocoques lactiques que nous avons isolés au cours des différents stades de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort ont été identifiés comme étant soit des *Str. lactis*, soit des *Str. cremoris* typiques (Devoyod & al., 1969).

Il est possible aussi que certains microorganismes doués de propriétés protéolytiques tels que staphylocoques, microcoques, entérocoques, augmentent la résistance au sel des bactéries lactiques. Rasic & al. (1965) ont montré en effet que certaines substances, comme la peptone, étaient susceptibles d'augmenter la résistance au chlorure de sodium des bactéries d'arôme : *Str. diacetilactis* et *Leuconostoc lactis*.

Au cours du « premier affinage », principalement en surface et à un degré moindre au centre du fromage, nous avons constaté un développement des levures avant celui des microcoques. Il semblerait que cette multiplication des levures avant celle des microcoques ait une certaine importance. En effet lorsque les microcoques se multiplient plus rapidement que les levures, la surface du fromage manque d'onctuosité, et, lors du « plombage », les feuilles d'étain adhèrent moins bien à la surface. Dans certains cas (acidité insuffisante du fromage, ensemencement important en microcoques protéolytiques présents dans le sel utilisé pour le salage), les microcoques se développent localement plus rapidement que les levures et il peut apparaître à la surface des fromages des défauts qui se présentent sous forme de taches arrondies dont l'aspect leur a fait donner le nom d' « auréoles ». Elles pénètrent plus ou moins profondément dans le fromage et entraînent une dépréciation de celui-ci.

Il est bien connu que la protéolyse et la lipolyse caractéristiques du fromage de Roquefort sont dues principalement à l'activité enzymatique de *P. roqueforti*. Cependant il est probable que la flore microbienne autre que *P. roqueforti* joue un rôle non négligeable dans l'arôme du fromage. Proks & al. (1959) ont montré par exemple que certaines levures isolées du Roquefort produisaient des substances aromatiques caractéristiques de ce fromage.

Certains microorganismes sont présents tout au long de la fabrication et de l'affinage, d'autres n'apparaissent qu'à des stades bien déterminés. On a ainsi constamment plusieurs microflore en concurrence et en équilibre dans le milieu. Ces microflore ont vraisemblablement un rôle non négligeable en déterminant les conditions de milieu optima pour le développement du *Penicillium*.

Reçu pour publication le 19 juillet 1968.

Résumé

On a étudié dans deux fabrications traditionnelles de fromage de Roquefort, l'évolution de la flore microbienne du fromage. Les germes totaux, les bactéries coliformes, les levures, les staphylocoques et microcoques ont été dénombrés aux différents stades de la fabrication et de l'affinage sur une période de 174 jours. Chaque groupe de microorganismes subit une évolution caractéristique au cours des trois stades principaux de la fabrication et de l'affinage (avant le salage, du salage à la mise des fromages sous feuille d'étain et pendant la deuxième période d'affinage).

Summary

The microbial flora of Roquefort cheese. I. Its evolution during cheese making and ripening :

Changes in the microbial flora of the surface and the interior of Roquefort cheese have been studied during the making and ripening of two batches of cheeses made by the traditional method of Roquefort. Total counts and counts of coliform organisms, yeasts, staphylococci and micrococci were made at different stages of the making and ripening during 174 days from the time of the renneting of the milk to the time of the sale of the cheeses.

Each group of microorganisms showed characteristic changes during the principal periods of the making and ripening of the cheeses (before salting, between salting and wrapping in tin foil, and during the second ripening period).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BABEL (F. J.). 1953. The role of fungi in cheese ripening. *Econ. Bot.*, **7**, 27.
- BAIRD-PARKER (A. c.). 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. appl. Bact.*, **25**, 12.
- CLARKE (J.) & GOLDING (N. S.). 1949. A comparison of starters for use in Roquefort type cheese. *Nat. Butt. Cheese*, **40**, 27.
- DEVOYOD (J.-J.). 1969a. La flore microbienne du fromage de Roquefort. II. Staphylocoques et microcoques. *Le Lait* (sous presse).
- DEVOYOD (J.-J.) & MULLER (M.). 1969. La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les Leuconostoc. *Le Lait* (sous presse).
- DEVOYOD (J.-J.) & BRET (G.). 1966. Evolution de la flore microbienne au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort. *XVII^e Cong. Int. de Laiterie*, D 62 585.
- DEVOYOD (J.-J.) & MULLER (M.). 1969. La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Le Lait* (sous presse).
- FOWELL (R. R.). 1952. Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. *Nature*, Lond., **170**, 578.
- GALZY (P.). 1967. Communication personnelle.
- MOCQUOT (G.) & BEJAMBES (M.). 1960. Technology of ewe's and goat's milk products. I. Ewe's milk products. *Dairy Sci. Abstr.*, **22**, 1.
- PROKS (J.), DOLEZALEK (J.) & PECH (Z.). 1959. A study of the coaction of the yeasts of the genus *Torulopsis* on the formation of the methyl ketones in the cheese of Roquefort type. *Int. Dairy Cong.*, **2**, 729.
- RASIC (J.), OBRADOVIC (B.) & MITIG (S.). 1965. Effect of peptone on the resistance of aroma producing bacteria to sodium chloride. *Milchwissenschaft*, **20**, 341.