Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort

IV. — ACTION INHIBITRICE DES MICROCOQUES CASEOLYTIQUES SUR L'OUVERTURE DU CAILLÉ

par

J. J. DEVOYOD (*), M. DESMAZEAUD (*), L. ASSENAT (**)
et J. AUCLAIR (*)

(avec la collaboration de Dominique MELCION, Brigitte ROUSSEAUX
et C. AURIAULT)

INTRODUCTION

L'ouverture du fromage de Roquefort est un phénomène important pour le développement ultérieur du *Penicillium* grâce auquel le fromage acquiert son aspect et son goût caractéristiques. Cette ouverture résulte de l'action des micro-organismes hétéro-fermentaires, en particulier des *Leuconostoc*.

Au cours de la période de lactation des brebis, par suite d'un trop faible ensemencement du lait de fabrication par les micro-organismes hétéro-fermentaires, il arrive parfois que l'ouverture du caillé soit insuffisante ; dans ce cas, le fromager peut intervenir utilement en apportant les *Leuconostoc* sous forme de levain. Il peut arriver aussi que l'ouverture souhaitée ne se produise pas malgré une acidification normale du caillé et un apport important de *Leuconostoc*. C'est l'étude du mécanisme de ce défaut d'ouverture en présence d'un grand nombre de *Leuconostoc* (provenant de la flore naturelle ou apportés sous forme de levain) qui fait l'objet du présent travail.

Depuis de nombreuses années, les fromagers avaient constaté qu'il existait une relation entre ces défauts d'ouverture et la présence inaccoutumée et en grand nombre de germes caséolytiques.

(*) Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits Animaux, I.N.R.A., Jouy-en-Josas (Yvelines).

(**) Laboratoire de la Société des Caves et des Etablissements Rigal, Roquefort (Aveyron).

Ils pensaient que ces germes modifiaient la texture du caillé et que le défaut d'ouverture résultait de cette modification de texture.

Le but de notre étude était de confirmer le rôle des organismes caséolytiques dans le défaut d'ouverture du caillé, de les identifier et éventuellement d'étudier leur mode d'action. Vingt-cinq souches de ces micro-organismes ont été isolées et identifiées. Leur action sur la croissance et la production de gaz des *Leuconostoc* a été étudiée en utilisant les techniques de cultures associées et de cultures dialysées (Devoyod et Desmazeaud, 1971). Nous montrerons que ces microcoques caséolytiques inhibent la production de gaz des *Leuconostoc* et que les composés responsables de cette inhibition peuvent être séparés par filtration sur gel et identifiés.

MATERIELS ET METHODES

1) Isolement et identification des micro-organismes caséolytiques

Les analyses bactériologiques étaient effectuées sur des échantillons de fromages de 24 h ne présentant aucune ouverture à la sonde. Les techniques utilisées ont été décrites antérieurement (Devoyod *et al.*, 1968 ; Devoyod, 1970). Les germes caséolytiques étaient recherchés par ensemencement des échantillons sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de lait écrémé stérile (concentration finale 1 p. 100). Cinq à dix colonies présentant un halo clair étaient prélevées et ensemencées sur bouillon nutritif (Shaw *et al.*, 1951). Après purification sur gélose nutritive additionnée de lait écrémé stérile, les souches étaient conservées à -30°C sur lait tournesolé (cultures non incubées).

Les caractères suivants d'identification ont été étudiés sur ces souches : morphologie, production de catalase, croissance en anaérobiose, action sur le lait tournesolé (lait de vache et lait de brebis), résistance au chlorure de sodium, production d'acétoïne, croissance à différentes températures, production d'acide à partir des sucres, lipolyse, hémolyse, recherche de la production de phosphatase et résistance aux antibiotiques. Les techniques utilisées ont été décrites antérieurement (Devoyod, 1969), à l'exception de la résistance aux antibiotiques déterminée sur la gélose pour antibiogramme B. D. Mérieux.

2) Action des microcoques caséolytiques vis-à-vis des *Leuconostoc*

a) Souches microbiennes

Les 6 souches de *Leuconostoc* (2 *L. lactis*, 2 *L. mesenteroides* et 2 *L. dextranicum*) utilisées au cours de cette étude ont été isolées du fromage de Roquefort. Les caractéristiques de ces souches ont fait l'objet de travaux antérieurs (Devoyod et Muller, 1969).

b) *Action sur la croissance*

L'action des microcoques caséolytiques sur la croissance des *Leuconostoc* a été étudiée en utilisant la technique des cultures dialysées (Devoyod et Desmazeaud, 1971). Les microcoques étaient cultivés sur lait autoclavé ou sur lait U.H.T. et les *Leuconostoc* sur lactosérum. La croissance des *Leuconostoc* était appréciée soit par dénombrement sur milieu de Mayeux et *al.* (1962), soit par néphélométrie (mesure au biophotomètre Bonnet-Maury et Jouan).

c) *Action sur la production de CO₂*

L'action des microcoques caséolytiques sur la production de gaz des *Leuconostoc* a été étudiée dans des cultures associées de ces deux germes en utilisant la méthode décrite par Holmes et *al.* (1968) pour mesurer la production de gaz des *Leuconostoc*.

3) Action des filtrats de culture de microcoques caséolytiques vis-à-vis des *Leuconostoc*

a) *Préparation des filtrats de culture de microcoques caséolytiques sur lait et sur lactosérum*

Dix souches de microcoques caséolytiques ont été utilisées. Elles étaient cultivées pendant 48 h à 30° C sur lait reconstitué autoclavé (20 mn à 118° C) et sur lactosérum (obtenu par action de la présure sur le lait reconstitué), filtré stérilement sur filtre Seitz EKS. Après incubation, les cultures étaient centrifugées puis stérilisées par filtration sur filtre Seitz EKS. Les filtrats étaient conservés à — 30° C.

b) *Action sur la croissance*

L'action des filtrats de culture vis-à-vis de la croissance des *Leuconostoc* a été appréciée en suivant, au biophotomètre enregistreur Bonnet-Maury et Jouan, la croissance des *Leuconostoc* sur du lactosérum additionné ou non de ces filtrats de culture.

c) *Action sur la production de CO₂*

L'action des filtrats de culture des microcoques caséolytiques sur la production de gaz des *Leuconostoc* a été étudiée en utilisant la méthode décrite par Holmes et *al.* (1968). On mesurait la production de gaz des *Leuconostoc* en culture sur du lait additionné des filtrats.

4) Séparation des substances inhibitrices par filtration sur gel

On a opéré sur 3 filtrats de culture de microcoque sur lait. Ces filtrats étaient amenés à pH 4,5 par addition d'acide acétique à 30 p. 100. Le précipité qui se formait était éliminé par centrifugation et le surnageant était concentré 5 fois, sous vide à 42° C. On déposait

5 ml de ce concentrat au sommet d'une colonne de chromatographie chargée en Biogel P-6 (100-200 mesh), puis on éluait avec de l'acide acétique M. Les fractions de 5 ml étaient recueillies au moyen d'un collecteur de fractions GME et analysées par mesure de l'absorption à 280 et 254 nm à l'Elugraphe Seive et par coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein (1954) sur 0,1 ml d'éluat. Le contenu des tubes qui correspondaient aux pics d'absorption était desséché sous vide à 42° C, redissous dans l'eau distillée stérile puis desséché à nouveau pour éliminer l'acide acétique. Les résidus ainsi obtenus étaient conservés à 4° C.

Avant utilisation, ces résidus étaient dissous dans l'eau distillée (pour les ramener à la concentration initiale) et filtrés sur filtre Seitz EKS. La quantité de tryptophane dans ces fractions était appréciée de façon semi-quantitative par la méthode de Feigl (1956), de façon quantitative par la méthode de Bencze et Schmid (1957).

5) Action des substances isolées par filtration sur gel sur la production de gaz des *Leuconostoc*

*a) Préparation des cultures de *Leuconostoc**

500 ml de milieu MRS (de Man et *al.*, 1960) étaient ensemencés avec 1 ml d'une culture de *Leuconostoc* (culture de 48 h à 22° C sur milieu MRS). Après incubation de 48 h à 22° C, les cultures étaient centrifugées, lavées avec une solution stérile de Ringer au 1/4, centrifugées à nouveau puis mises en suspension dans 10 ml de solution stérile de Ringer au 1/4. La teneur en micro-organismes de ces suspensions était appréciée par dénombrement sur le milieu décrit par Mayeux et *al.* (1962).

b) Mesure de la production de CO₂ par la méthode manométrique

Après équilibrage en température (30° C), les cellules de *Leuconostoc* étaient mises en contact du lait stérile additionné ou non des substances séparées par filtration sur gel. La quantité de CO₂ dégagée était mesurée au respiromètre différentiel Gilson G-14 en utilisant la méthode manométrique directe de Umbreit et *al.* (1964).

RESULTATS

1) Identification des micro-organismes caséolytiques

Vingt-cinq souches de micro-organismes caséolytiques ont été isolées de 4 échantillons de fromages, échantillons prélevés 24 h après l'emprésurage ; ces fromages ne présentaient aucune ouverture malgré une acidification correcte de la pâte et malgré la présence de *Leuconostoc* apportés sous forme de levain.

Les 25 souches isolées présentaient en commun les caractères suivants :

a) A l'examen microscopique elles se présentaient sous forme de coques, disposés par deux, souvent en tétrades ou en petits amas ; elles étaient catalases-positives et ne produisaient pas d'acide à partir du glucose en anaérobiose. Ces souches peuvent donc être considérées comme appartenant au genre *Micrococcus*.

b) Elles produisaient de l'acide à partir du glucose en aérobie et ne produisaient pas d'acétone à partir du glucose ; elles ne possédaient pas de phosphatase. Les 25 souches peuvent donc être classées dans le sous-groupe 5 de la classification de Baird-Parker (1963).

c) Elles produisaient de l'acide à partir du lactose. Toutes les souches de microcoques isolées étaient sensibles aux 9 antibiotiques essayés (chloramphénicol, érythromycine, kanamycine, néomycine, novobiocine, pénicilline, staphylomycine, streptomycine et tétracycline).

2) Action des microcoques caséolytiques sur les *Leuconostoc*

a) Action sur la croissance

En utilisant la technique des cultures dialysées (voir plus haut), on a constaté que le développement des *Leuconostoc* sur lactosérum, qu'il soit apprécié par dénombrement ou par néphélométrie, n'était pas influencé par les substances dialysables provenant de la culture des microcoques caséolytiques sur lait ; la croissance des *Leuconostoc* était la même, qu'ils se développent contre du laitensemencé avec les microcoques ou contre le même lait nonensemencé.

TABLEAU 1

Action des microcoques caséolytiques sur la production de gaz des *Leuconostoc*

		Quantité de gaz produite (en ml)
<i>Leuconostoc lactis</i> 6	seul	6
	+ microcoque RC1	0,2
	+ microcoque RC2	0,5
	+ microcoque RC3	0,6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 471	seul	5
	+ microcoque RC1	0,2
	+ microcoque RC2	0,6
	+ microcoque RC3	0,4

Incubation : 1 semaine à 25° C.

Milieu : Lait autoclavé 20 mn à 118° C.

Inoculum : *Leuconostoc* 5 p. 100.

Microcoque 1 p. 100.

b) Action sur la production de gaz

Dans le tableau 1 nous avons porté les quantités de gaz produites par deux souches de *Leuconostoc*, cultivées seules ou en association avec des microcoques caséolytiques ; nous voyons que cette production de gaz est fortement ralentie lorsque les *Leuconostoc* sont cultivés avec les microcoques caséolytiques. Ainsi, par exemple, en présence de la souche de microcoque caséolytique RC1, les quantités de CO₂ produites par *L. lactis* 6 et *L. mesenteroides* 471 représentent respectivement 3 et 4 p.100 environ de celles produites par ces *Leuconostoc* seuls.

3) Action des filtrats de culture des microcoques caséolytiques sur les *Leuconostoc*

a) Action sur la croissance

En cultivant plusieurs souches de *Leuconostoc* sur du lactosérum additionné (essais) ou non (témoins) de filtrats de culture de microcoques sur lait ou sur lactosérum (concentration finale 3 p. 100), nous n'avons constaté aucune action de ces filtrats, ni stimulante, ni inhibitrice, sur la croissance des *Leuconostoc* ; les courbes de croissance des essais et des témoins, courbes enregistrées au biophotomètre, étant pratiquement confondues (même temps de latence, même taux de croissance et même maximum de croissance).

TABLEAU 2

Action des filtrats de culture de microcoques caséolytiques sur la production de CO₂ des *Leuconostoc*

		Quantité de gaz produite (en ml)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 23	seul	7
	+ 3 p. 100 filtrat culture RC1 microcoque sur lait	0,8
	+ 3 p. 100 filtrat culture RC1 microcoque sur lactosérum	6,2
<i>Leuconostoc dextranicum</i> 18	seul	6
	+ 3 p. 100 filtrat culture RC3 microcoque sur lait	0,5
	+ 3 p. 100 filtrat culture RC3 microcoque sur lactosérum	5,5

Incubation : 1 semaine à 25° C.

Milieu : Lait autoclavé 20 mn à 118° C.

Inoculum : 5 p. 100.

b) Action sur la production de gaz

Dans le tableau 2, nous avons porté les quantités de gaz produites par deux souches de *Leuconostoc* cultivées dans du lait autoclavé, additionné ou non de filtrats de culture de microcoques caséolytiques sur lait et sur lactosérum. Ces résultats montrent que la production de gaz des *Leuconostoc* est inhibée lorsqu'on ajoute un

fig. 1

Courbe d'élution d'un filtrat de culture de microcoques caséolytiques RC1 sur lait

Colonne $\varnothing$ 25 mm, h. 1450 mm.

Biogel P-6.

Eluant CH_3COOH M, pH 3.

Charge : 5 ml de filtrat concentré 5 fois.

Volume des fractions : 5 ml.

————— Lecture à 570 nm (après coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein, 1954).

----- Lecture à 280 nm (Elugraphe Seive).

filtrat de culture de microcoques sur lait. Par contre l'addition d'un filtrat de culture de microcoques sur lactosérum n'a aucune action sur la production de gaz des *Leuconostoc*. En présence de 5 p.100 de filtrat de culture de microcoque RC3 sur lait, la quantité de CO_2 produite par *L. dextranicum* 18 ne représente, par exemple, que 8 p.100 environ de la production de CO_2 de cette même souche de

fig. 2

Courbe d'élution d'un filtrat de culture de microcoques caséolytiques RC3 sur lait

Colonne Ø 25 mm, h. 1450 mm.

Biogel P-6.

Eluant CH_3COOH M, pH 3.

Charge : 5 ml de filtrat concentré 5 fois.

Volume des fractions : 5 ml.

————— Lecture à 570 nm (après coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein, 1954).

----- Lecture à 280 nm (Elugraphe Seive).

Leuconostoc sur lait autoclavé, tandis qu'en présence de filtrat de culture de microcoques sur lactosérum, la production de CO₂ de *L. dextranicum* 18 est très proche de celle de *L. dextranicum* 18 seul.

4) Séparation des substances produites par les microcoques caséolytiques inhibant la production de CO₂ des *Leuconostoc*

Les filtrats de culture sur lait de trois souches de microcoques caséolytiques ont été chromatographiés sur gel. Les figures 1 et 2 montrent les courbes d'élution obtenues avec deux de ces filtrats. On observe 6 ou 7 pics d'absorption. Nous avons vérifié que les pics P6 et P7 dont le volume d'élution est supérieur au volume total de la colonne contenaient bien des peptides riches en acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) ce qui explique leur retard d'élution. Ces courbes d'élution sont différentes de celles obtenues avec d'autres micro-organismes caséolytiques isolés de produits laitiers : *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* (Devoyod et Desmazeaud, 1970) ou *Micrococcus caseolyticus* (Desmazeaud et Devoyod, 1970).

Le contenu des tubes correspondant à chaque pic d'absorption a été réuni et les 13 fractions ainsi obtenues ont été essayées pour

TABLEAU 3

Action sur la production de CO₂ des *Leuconostoc* des différentes fractions de filtrats de culture de microcoques caséolytiques sur lait

Fractions correspondant aux pics d'absorption			<i>L. lactis</i> 6 25 × 10 ⁹ cellules	<i>L. mesenteroides</i> 471 30 × 10 ⁹ cellules
Microcoques caséolytiques	RC1	P ₁	—	—
		P ₂	420	360
		P ₃	430	310
		P ₄	410	320
		P ₅	425	300
		P ₆	85	72
	RC3	P ₁	445	310
		P ₂	422	390
		P ₃	398	320
		P ₄	392	365
		P ₅	410	340
		P ₆	148	180
		P ₇	55	35
	Témoin		400	320

Quantité de substances ajoutées : 0,08 p. 100 (concentration finale).

Les résultats sont donnés en µl de CO₂ après 2 h à 30° C.

leur pouvoir inhibiteur éventuel sur la production de CO_2 par les *Leuconostoc*. On voit, dans le tableau 3, que les substances inhibant la production de gaz des *Leuconostoc* se trouvent dans les pics correspondant aux substances riches en tyrosine et tryptophane (pic P6 pour le filtrat de culture du microcoque RC1 et pics P6 et P7 pour le filtrat de culture du microcoque RC3).

Dans le tableau 4, nous avons porté les productions de CO_2 des *Leuconostoc* en présence de tyrosine et de tryptophane. On voit que le tryptophane a une action inhibitrice sur la production de gaz des *Leuconostoc* et à un degré moindre la tyrosine, mais cette action est bien moins marquée que celle des substances inhibitrices des filtrats de culture de microcoques caséolytiques sur lait.

TABLEAU 4

Action du tryptophane et de la tyrosine sur la production de CO_2 des *Leuconostoc*

	<i>L. Lactis</i> 6 42×10^9 cellules	<i>L. mesenteroides</i> 471 28×10^9 cellules
Tryptophane	310	230
Tyrosine	400	310
Témoin	450	300

Quantité de substances ajoutées : 0,02 p. 100 (concentration finale).

Les résultats sont donnés en μl de CO_2 après 2 h à 30° C.

DISCUSSION

Les microcoques qui présentent une action inhibitrice vis-à-vis de la production de CO_2 des *Leuconostoc*, et par là-même jouent un rôle néfaste sur l'ouverture du caillé, appartiennent à un sous-groupe de la classification de Baird-Parker (1963) assez répandu dans les produits laitiers. D'après Asperger (1965), ces microcoques du sous-groupe 5 représentent 24,5 p. 100 des microcoques isolés du lait de vache et des fromages. L'un de nous a montré que ces microcoques constituaient 23 p. 100 des microcoques isolés du lait cru de brebis, du sel utilisé pour le salage du fromage et de fromages de Roquefort (Devoyod, 1969). Cependant les souches isolées dans ces produits ne présentaient pas le caractère très fortement protéolytique que possèdent les souches qui inhibent la production de CO_2 des *Leuconostoc*. Bien qu'une recherche systématique de l'origine de ces

souches n'ait pas été effectuée, il est vraisemblable que ces micro-organismes proviennent du matériel utilisé pour la récolte du lait : en effet, des souches de microcoques appartenant au sous-groupe 5 de la classification de Baird-Parker et très fortement caséolytiques ont été isolées de l'eau de rinçage des machines à traire (Richard et Devoyod, 1964).

L'action inhibitrice, sur la production de gaz des *Leuconostoc*, de substances se trouvant dans les pics correspondant aux peptides riches en acides aminés aromatiques n'est pas exceptionnelle. En effet des substances inhibant la production de gaz des *Leuconostoc* ont été également isolées de filtrats de culture d'entérocoques, et ces substances correspondaient aussi à des peptides riches en acides aminés aromatiques (Devoyod et Desmazeaud, 1970). Cependant il est important de remarquer que cette inhibition n'est pas liée à la seule présence de la tyrosine ou du tryptophane puisque ces acides aminés, individuellement, ne provoquent qu'une faible inhibition de la production de gaz. Il est donc vraisemblable que la composition en acides aminés des peptides inhibiteurs, et leur séquence dans la molécule, interviennent dans les phénomènes d'inhibition.

Dans le cas des entérocoques caséolytiques, on trouvait, dans les filtrats de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lait, à côté de substances qui inhibaient la formation de gaz par les *Leuconostoc*, des substances qui stimulaient cette production de gaz. (Devoyod et Desmazeaud, 1970). Le résultat global était une stimulation de la production de gaz. Il en était de même dans le cas de l'hydrolysate de caséine totale par les enzymes protéolytiques de ce germe. Par contre avec les microcoques caséolytiques, nous ne trouvons pratiquement pas de substances stimulant la production de gaz à côté des substances inhibitrices et le résultat global est une inhibition marquée de la production de CO_2 par les *Leuconostoc*.

La production de gaz des *Leuconostoc* n'est perceptible que lorsque leur population atteint 10^8 germes/g environ (Holmes et al., 1968 ; Devoyod et Muller, 1969). Le fait que les substances produites par les microcoques caséolytiques n'ont aucune action sur la croissance des *Leuconostoc* mais uniquement sur leur production de gaz, explique d'une part que l'on puisse rencontrer des défauts d'ouverture du caillé même lorsque la population des *Leuconostoc* atteint et même dépasse très largement le seuil de 10^8 germes/g et d'autre part que l'addition en grand nombre de *Leuconostoc* ne remédie pas au défaut constaté.

Pour remédier à ce défaut d'ouverture du caillé, défaut dû à la présence de microcoques caséolytiques, nous pensons qu'actuellement la solution la meilleure est l'élimination de ces germes et qu'en présence de tels accidents une attention toute particulière doit être accordée à la vaisselle laitière. Toutefois, nous recherchons également des souches de *Leuconostoc* (ou autres) peu sensibles à l'action des microcoques caséolytiques de façon à utiliser ces souches

dans les zones de fabrication où ces défauts d'ouverture sont fréquents. Sur le plan pratique l'obtention de telles souches présenterait un intérêt certain, sur le plan théorique elles nous permettraient de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de la production de CO_2 par les *Leuconostoc*, mécanisme qu'il est indispensable de bien connaître si l'on veut utiliser à bon escient des associations microbiennes dans les fabrications fromagères de type bleu.

Résumé

L'ouverture du fromage de Roquefort est un phénomène important pour le développement ultérieur du *Penicillium*. Cette ouverture, que l'on constate dans les 48 premières heures de la fabrication, résulte de l'action de micro-organismes hétéro-fermentaires, en particulier des *Leuconostoc*.

Cette ouverture souhaitée peut ne pas se produire malgré une acidification normale du caillé et malgré la présence en grand nombre de *Leuconostoc*. On constate généralement ce défaut d'ouverture du caillé en même temps qu'une prolifération anormale de micro-organismes caséolytiques.

Le but de notre étude était de confirmer le rôle des organismes caséolytiques dans le défaut d'ouverture du caillé, de les identifier et d'étudier leur mode d'action.

Vingt-cinq souches de ces micro-organismes ont été isolées, elles ont été identifiées comme étant des microcoques. Leur action sur la croissance et la production de gaz des *Leuconostoc* a été étudiée. Ces microcoques caséolytiques inhibent la production de gaz des *Leuconostoc*. Les composés responsables de cette inhibition ont été séparés par filtration sur gel et identifiés comme étant des peptides riches en acides aminés aromatiques, tyrosine et tryptophane.

Summary

Microbial associations in Roquefort cheese

IV. Inhibitory action of caseolytic micrococci in the openness of the curd

The openness of the curd of Roquefort cheese is an important factor in the later development of *Penicillium* which gives to the cheese its characteristic appearance and taste. This openness is the result of the action of heterofermentative microorganisms, especially of *Leuconostoc* organisms. It may happen that this desired openness does not occur in spite of a normal acidification of the curd, even when there is a large number of *Leuconostoc* organisms. When this

fault is observed there is usually also an excessive proliferation of caseolytic microorganisms.

The aim of this research was to confirm the role of the caseolytic microorganisms in the lack of openness of the curd, to identify them and to study their mode of action.

25 strains of these microorganisms were isolated, they were identified as micrococci. Their action on the growth and gas production of *Leuconostoc* organisms was studied. These caseolytic micrococci inhibit the gas production of *Leuconostoc* organisms. The substances responsible for this inhibition were separated by gel filtration and identified as aromatic amino-acids containing peptides.

Remerciements

Nous remercions vivement M. Hermier pour ses suggestions et ses critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans l'élaboration de ce travail.

Reçu pour publication en décembre 1971.

Références bibliographiques

- [1] ASPERGER (H.) (1965). — Zur Klassifikation der Mikrokokken-Staphilokokken aus milchwirtschaftlicher Sicht. *Oster. Milchwirtschaft*, 20, 23.
- [2] BAIRD-PARKER (A. C.) (1963). — A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30, 409.
- [3] BENCZE (W. L.) and SCHMID (K.) (1957). — Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, 29, 1193.
- [4] DESMAZEAUD (M.) et DEVOYOD (J. J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique des substances stimulantes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 10, 413.
- [5] DEVOYOD (J. J.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. II. Staphylocoques et microcoques. *Le Lait*, 481-482, 1.
- [6] DEVOYOD (J. J.) (1970). — Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. II. Action de *Penicillium roqueforti* sur l'évolution de la flore microbienne. *Le Lait*, 499-500, 644.
- [7] DEVOYOD (J. J.), BRET (G.) et AUCLAIR (J.) (1968). — Flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage. *Le Lait*, 479-480, 613.
- [8] DEVOYOD (J. J.) et MULLER (M.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*. Influence de différents micro-organismes de contamination. *Le Lait*, 487, 369.
- [9] DEVOYOD (J. J.) et DESMAZEAUD (M.) (1970). — Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*. Nature des substances stimulantes produites par *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *Le Lait*, 497, 374.

- [10] DEVOYOD (J. J.) et DESMAZEAUD (M.) (1971). — Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. III. Action des entérocoques et des levures fermentant le lactose vis-à-vis des lactobacilles. *Le Lait*, 507, 399.
 - [11] FEIGL (F.) (1956). — Spot test in organic analysis. 5th ed. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 278.
 - [12] HOLMES (B.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1968). — Some factors influencing carbon dioxide production by *Leuconostoc citrovorum*. *Appl. Microbiol.*, 16, 56.
 - [13] DE MAN (J. C.), ROGOSA (M.) and SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.*, 23, 310.
 - [14] MAYEUX (J. V.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1962). — A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, 655.
 - [15] MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1954). — A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol Chem.*, 211, 907.
 - [16] RICHARD (J.) et DEVOYOD (J. J.) (1964). — Résultats non publiés.
 - [17] SHAW (C.), STITT (J. M.) and COWAN (S. T.) (1951). — Staphylococci and their classification. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 100.
 - [18] UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) and STAUFFER (J. F.) (1964). — Manometric techniques. 4th ed., Burgess Publishing Co, Minneapolis.
-