Etude sur la microflore lactique du fromage « Vacherin Mont-d'Or »

par

T. SOZZI et R. MARET

*Département de développement technologique
Société d'Assistance technique pour produits Nestlé S.A.,
Laboratoire Industriel Orbe - 1350 Orbe (Suisse)*

avec la collaboration technique de Reine ASTRUC

INTRODUCTION

Les résultats des études sur la flore microbienne du fromage Vacherin mûr [1] et sur son évolution au cours de la maturation [2] ont déjà fait l'objet de deux publications.

Comme la flore lactique de ce fromage reste encore mal connue, il nous est apparu intéressant dans le cadre de notre travail sur les micro-organismes du Vacherin, de mettre en évidence quelques caractéristiques biologiques des ferments lactiques isolés au cours de la maturation.

MATERIEL ET METHODES

Après purification comme précédemment [2], les souches lactiques isolées ont été lyophilisées.

Au laboratoire, les cultures sont repiquées à 1 p. 100 dans le milieu de de Man, Rogosa et Sharpe liquide [3] et incubées pendant 6 h à la température optimale de croissance.

Tests d'identification communs aux streptocoques et aux lactobacilles

1) Morphologie

L'examen microscopique est effectué sur une culture de 6 h en bouillon MRS, sans coloration au microscope à contraste de phase, et après coloration de G.

2) *Présence de catalase*

Un ml d'une culture fraîche en MRS est ajouté à 1 ml d'une solution d'eau oxygénée à 10 p. 100. On observe la formation éventuelle de bulles d'oxygène.

3) *Croissance à différentes températures*

Les tubes contenant du bouillon MRS sont amenés préalablement à la température de 15° C et 45° C pour les lactobacilles, à 10,40° C et 45° C pour les streptocoques, puis inoculés à 1 p. 100.

Le développement des souches est apprécié après 24 et 48 h par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé, incubé à la même température (appréciation visuelle de la turbidité).

4) *Production de CO₂ à partir du glucose*

On la recherche sur le milieu modifié de Gibson et Abd-el-Malek [4].

Au moment de l'emploi, le milieu est fondu au bain-marie bouillant, ramené à 50° C et inoculé à 10 p. 100 avec chaque culture.

Après refroidissement, on coule un bouchon de gélose dans les tubes.

Les cultures sont examinées chaque jour pendant 2 sem.

5) *Inhibition par le chlorure de sodium*

Les souches sont cultivées pendant 72 h dans le milieu MRS contenant 2, 4 et 6,5 p. 100 NaCl (concentration finale).

Le développement des cultures est apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé à la même température (examen de la turbidité, mesure de l'acidité).

6) *Activité protéolytique*

La méthode détaillée fera l'objet d'une prochaine publication. Les souches sont cultivées sur un milieu à base de protéines du lait partiellement purifiées par chromatographie sur colonne de Sephadex G 25, et de lactose. L'incubation dure 1 sem. Les variations quantitatives de l'azote soluble du milieu (après précipitation des protéines par de l'acide trichloracétique) sont suivies par un dosage à la ninhydrine [5].

7) *Température optimale de croissance*

Les souches sont repiquées à 1 p. 100 dans le bouillon YDB [6] et placées dans un incubateur à gradient de température, selon Oppenheimer et Drost-Hansen [7]. L'échelle des températures étudiées est comprise entre 25° C et 50° C.

Après 6 et 8 h d'incubation, le développement microbien est apprécié par mesure de la turbidité dans un spectrophotomètre Bausch et Lomb à 570 nm.

8) *Production d'acide lactique et configuration de l'acide lactique produit*

Elles sont déterminées selon la méthode décrite par Lunder [8] et Mattson [9].

Tests supplémentaires pour les lactobacilles

1) *Mesure de l'activité acidifiante*

Elle est faite selon la méthode décrite par T. Sozzi [10].

2) *Production d'acide à partir des glucides*

La technique de Buttiaux est utilisée [11].

On a testé les sucres suivants :

Arabinose, glucose, lactose, mélibiose, xylose, inositol, raffinose, rhamnose, saccharose, sorbitol et tréhalose.

Tests supplémentaires pour les streptocoques

1) *Action sur le lait tournesolé*

Les changements apparus dans le lait tournesolé — réduction, coagulation, présence de sérum et digestion —, sont notés après 6 - 24 - 48 - 72 h et 1 sem d'incubation à 30° C.

2) *Croissance à pH 9,6*

Après stérilisation, le bouillon MRS est ajusté à pH 9,6 et inoculé à 1 p. 100. La lecture de la croissance microbienne est faite par examen de la turbidité après 6 et 24 h d'incubation.

3) *Production d'acide à partir des glucides*

Le milieu utilisé est celui de Hauduroy [12].

On a testé les sucres suivants :

Arabinose, lactose, maltose, mannitol, saccharose, salicine, sorbitol et tréhalose.

4) *Production de Nisine*

Pour mettre en évidence la production d'antibiotique par les souches, la technique de Tramer [13] est employée.

5) *Désamination de l'arginine*

On utilise le milieu et la technique de Niven [14].

6) *Production d'acétoïne en milieu citaté*

Après 48 h et 1 sem d'incubation sur milieu de Swartling [15], la recherche de l'acétoïne est faite selon la méthode Barritt [16].

7) *Production de dextranes* (leuconostoc seulement)

L'augmentation de viscosité du milieu de Garvie [17] est appréciée après 1 sem d'incubation par comparaison avec un tube témoin non inoculé.

8) *Hydrolyse de l'esculine* (leuconostoc)

La technique suivie est la même que celle de Devoyod [18].

9) *Production de gaz à partir du citrate* (leuconostoc)

Elle est décelée comme l'indique Devoyod [18].

RESULTATS

1) Dans le tableau 1, les résultats relatifs aux caractéristiques biochimiques des 27 souches appartenant au groupe des lactobacilles sont comparées à deux souches de référence, *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) et *Lactobacillus casei* (ATCC 25180).

Toutes les souches étudiées sont homofermentaires et mésophiles. Elles peuvent en commun se développer à 15° C et 30° C, mais pas à 45° C, avoir une température optimale de croissance comprise entre 33° C et 37° C, ne pas être inhibées par 2 et 4 p. 100 de sel (sauf un groupe). Par contre 6 souches seulement tolèrent 6,5 p. 100 de sel.

Les lactobacilles sont divisés en lactobacilles type *casei* et lactobacilles type *plantarum* en fonction de l'acide lactique qu'ils produisent.

Les lactobacilles *casei* du groupe 1 ont la propriété de ne pas se développer en présence de 4 p. 100 de sel, et d'avoir une activité acidifiante et un pouvoir protéolytique élevés.

Les caractéristiques du groupe 2 sont très proches de celles du *Lactobacillus casei* utilisé comme témoin.

Parmi les lactobacilles type *plantarum*, le groupe 1 rassemble des souches ayant des caractéristiques intermédiaires entre les groupes *casei* et *plantarum* du point de vue morphologie, pouvoir acidifiant et fermentations sucrées. Ce qui justifie leur rattachement au groupe *plantarum* vient de ce qu'ils produisent de l'acide lactique DL.

Les propriétés des souches appartenant aux groupes 2 et 3 sont assez semblables, mais les activités protéolytique et acidifiante sont supérieures dans le groupe 3.

Il est intéressant de noter que les lactobacilles ont été pour une grande partie isolés de MRS (15 souches sur 27), alors que les autres proviennent de milieux très variés.

TABLEAU 1. — Caractères biochimiques des lactobacilles de Vacherin

	<i>L. casei</i>			<i>L. plantarum</i>			
	Groupe 1	Groupe 2	ATCC 25180	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	ATCC 8014
Nombre de souches	2	3		5	13	4	
Production CO ₂	0/2	0/3	—	0/5	0/13	0/4	—
Catalase	0/2	0/3	—	0/5	0/13	0/4	—
Morphologie :							
arabesque	2/2	3/3		2/5			
isolés - paires chaînes				2/5 1/5	2/11 11/13	3/4 1/3	+
Croissance à :							
15° C	2/2	3/3	+	5/5	13/13	4/4	+
45° C	0/2	0/3	—	0/5	0/13	0/4	—
Température optimale de croissance	34-36° C	33-35° C		34-35° C	34-37° C		34-35° C
Croissance dans :							
2 p. 100 sel	2/2	3/3	+	5/5	13/13	4/4	+
4 p. 100	0/2	3/3	+	5/5	13/13	4/4	+
6,5 p. 100	0/2	1/3	+	0/5	4/13	1/4	+
Activité acidifiante	20.5° SH	11.5° SH	12° SH	11.5-13.5	17.5-21	23-25.5	
Activité protéolytique	1.4-1.8	0.57	0.73	0.60-0.62	0.40-0.45	0.60-0.75	
Acide lactique	L ⁺	L ⁺	L ⁺	DL	DL	DL	DL

	<i>L. casei</i>			<i>L. plantarum</i>			
	Groupe 1	Groupe 2	ATCC 25180	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	ATCC 8014
Fermentation sucrée :							
arabinose	1/2	0/1	—	0/1	4/4		+
inositol	0/2	0/1	—	0/1	1/4		+
mélibiose	1/2	0/1	—	0/1	4/4		+
raffinose	0/2	0/1	—	0/1	1/4		+
rhamnose	0/2	0/1	—	0/1	2/4		+
saccharose	1/2	0/1	+	0/1	4/4		+
sorbitol	2/2	0/1	+	0/1	4/4		+
tréhalose	2/2	0/1	+	0/1	3/4		+
xylose	1/2	0/1	—	0/1	4/4		+
lactose	2/2	1/1	+	1/1	4/4		+
glucose	2/2	1/1	+	1/1	4/4		+
Milieu d'isolement :							
PCAL		1/3			1/13		
MSA		1/3		1/5	1/13		
PCA					1/13		
A.A.		1/3					
P.T.L.				1/5			
KFS					4/13		
MRS	2/2			3/5	6/13	4/4	

Fraction : $\frac{\text{nombre de souches positives}}{\text{nombre de souches essayées}}$

TABLEAU 2. — Caractères biochimiques des leuconostoc de Vacherin

	Groupe 1	Groupe 2
Nombre de souches	7	9
Production de catalase	—	—
Production CO ₂ à partir du glucose	7/7	9/9
Configuration de l'acide lactique	D 7/7	D 9/9
Croissance à		
10° C	5/7	9/9
40° C	5/7	1/9
45° C	1/7	0/9
Température optimale de croissance	30-34° C	33-34° C
Croissance en présence de NaCl :		
2 p. 100	7/7	5/9
4 p. 100	7/7	3/9
6,5 p. 100	7/7	0/9
Action sur le lait tournesolé	R.C.* 7/7	I* 9/9
Production NH ₃ à partir de l'arginine	0/7	0/9
Production acétoïne à partir du citrate	0/7	0/9
Production de dextranes	0/7	0/9
Hydrolyse de l'esculine	1/7	0/9
Production gaz à partir du citrate	0/7	0/9
Production d'antibiotiques	0/3	0/2
Activité protéolytique	0.48-0.50	0.40-0.45

		Groupe 1	Groupe 2
Production d'acide à partir de :	arabinose	1/6	1/7
	lactose	6/6	2/7
	maltose	4/6	2/7
	mannitol	2/6	0/7
	saccharose	2/6	4/7
	salicine	2/6	0/7
	sorbitol	2/6	0/7
	tréhalose	4/6	2/7
Milieu d'isolement	PCA	1/7	2/9
	PCAL		2/9
	MSA		1/9
	KFS	1/7	
	MRS	5/7	4/9

Fraction = $\frac{\text{nombre de souches positives}}{\text{nombre de souches testées}}$

*R.C.

= Réduit - Coagulé

I

= Inchangé

2) Parmi les 67 souches de streptocoques isolés, 16 appartiennent au groupe des hétérofermentaires.

a) Ces 16 souches sont anaérobies facultatives, dépourvues de catalase, productrices de gaz à partir du glucose. A l'examen microscopique, elles apparaissent sous forme de coques groupés par 2 ou en courtes chaînes.

Leurs caractéristiques biochimiques sont données dans le tableau 2.

On a distingué 2 groupes de leuconostoc sur la base des critères suivants :

Groupe 1 : croissance en présence de 6,5 p. 100 de sel, réduction et coagulation du lait tournesolé.

Groupe 2 : croissance inhibée par 6,5 p. 100 de sel, aucune action sur le lait tournesolé.

Nous pouvons remarquer que les souches du groupe 1 ont une activité protéolytique légèrement plus élevée et qu'elles sont plus tolérantes vis-à-vis des températures élevées et des concentrations élevées en sel.

Par contre, toutes les souches produisent de l'acide lactique D, aucune n'est productrice d'ammoniaque à partir de l'arginine, d'acétoïne en milieu citraté, de gaz à partir du citrate, de dextrane, ni d'antibiotiques.

Une seule souche hydrolyse l'esculine.

La température optimale de croissance est la même dans les 2 groupes et les fermentations sucrées n'ont qu'une valeur indicative.

La gamme des milieux d'isolement est assez large mais avec une prédominance du MRS (9 souches sur 16 ont été isolées de ce milieu).

b) Les 51 streptocoques homofermentaires isolés sont dépourvus de catalase, produisent de l'acide lactique L⁺ et apparaissent sous forme de coques par paires ou en chaînes.

En comparant les caractéristiques biochimiques de ces souches (tab. 3) avec les critères classiques de classification des streptocoques, il apparaît que 9 souches correspondent à la description des *Str. lactis*, 2 à celle des *Str. cremoris*, 1 à celle des *Str. thermophilus* et 39 à celle des entérocoques. Ce dernier groupe a lui-même été subdivisé en 3 sous-groupes sans attribution de nom d'espèces.

Sur les 9 *Str. lactis*, 8 sont capables de se développer à 10° C et 40° C, mais aucun à 45° C. Ils ne sont pas inhibés par le sel à la concentration de 2 à 4 p. 100 mais à la concentration de 6,5 p. 100. Ils réduisent et coagulent le lait tournesolé, produisent de l'ammoniaque

à partir de l'arginine (sauf 1), ne produisent pas d'acétoïne à partir du citrate, ne se développent pas à pH 9,6. Leur température optimale de croissance est de 34° C, leur activité protéolytique faible.

Les fermentations sucrées ne diffèrent pas de celles des *Str. lactis* classiques.

On remarque que ces *Str. lactis* ont été isolés de milieux très variés : PCA, PCAL, KFS, PTL et MRS.

Deux souches seulement ont des caractéristiques les rapprochant des *Str. cremoris*, à savoir : développement à 10° C mais pas à 40° C, ni à pH 9,6, ni avec 4 et 6,5 p. 100 de sel ; pas de production d'ammoniaque à partir de l'arginine, ni d'acétoïne en milieu citraté.

Cependant, 2 résultats atypiques ont été obtenus : les 2 souches sont incapables de coaguler le lait et se développent en présence de 2 p. 100 de sel.

Une seule souche répond aux caractères des *Str. thermophilus*. Elle est inhibée par le sel même à faible concentration, ne se développe qu'aux températures supérieures à 10° C, coagule le lait tournesolé sans toutefois le réduire complètement, n'hydrolyse pas l'arginine, et ne fermente pas le citrate.

Elle a un pouvoir protéolytique presque nul.

Le groupe le plus représenté est celui des entérocoques. Ces micro-organismes sont halotolérants, réduisent et coagulent le lait tournesolé, métabolisent l'arginine mais pas le citrate.

Le sous-groupe 1 rassemble les germes aux caractéristiques intermédiaires entre les streptocoques lactiques et les streptocoques fécaux : mésophiles, ils ne se développent pas à 45° C mais à 10° C et 40° C ; ils ne se multiplient guère si le pH du milieu est trop élevé ; ils ont une activité protéolytique faible.

Les entérocoques du sous-groupe 2 ont un gradient de température étroit : leur croissance ne s'effectue ni à 10° C, ni à 45° C, mais de préférence entre 33° C et 35° C. Ils protéolysent peu les protéines du lait, et certains peuvent se développer à pH 9,6. Une souche est productrice d'antibiotiques.

Les 20 streptocoques du sous-groupe 3 sont des entérocoques plus typiques que les précédents, si l'on fait abstraction de leur inaptitude à croître aux basses températures.

Ils sont nettement thermophiles avec un optimum situé entre 36° C et 39° C ; une forte alcalinité n'inhibe pas leur développement ; ils sont presque tous à même de fermenter le sorbitol.

Enfin, leur activité protéolytique dépasse celle des autres groupes.

Plus de la moitié d'entre eux ont été isolés de KFS.

TABLEAU 3. — Caractères biochimiques des streptocoques isolés de Vacherin

	<i>Lactis</i>		<i>Cremoris</i>		<i>Thermophilus</i>		Entérocoques			
		<i>Str. lactis</i>		<i>Str. cremoris</i>		<i>Str. thermophilus</i>	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	<i>Str. faecalis</i>
Nombre de souches	9	—	2	—	1	—	6	13	20	—
Production de catalase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acide lactique	L+	L+	L+	L+	L+	L+	L+	L+	L+	L+
Croissance à :										
10° C	8/9	+	2/2	+	0/1	—	6/6	0/13	0/20	+
40° C	8/9	+	0/2	—	1/1	+	4/6	13/13	20/20	+
45° C	0/9	—	0/2	—	1/1	+	0/6	0/13	20/20	+
Température optimale de croissance	34° C		N.D.		N.D.		N.D.	33-35° C	36-39° C	
Croissance en présence de NaCl :										
2 p. 100	9/9	+	2/2	—	0/1	—	6/6	13/13	20/20	+
4 p. 100	9/9	+	0/2	—	0/1	—	6/6	13/13	20/20	+
6,5 p. 100	0/9	—	0/2	—	0/1	—	6/6	13/13	20/20	+
Action sur le lait tournesolé	R.C. 9/9	R.C.	R.nC 2/2	R.C.	R faible C	R faible C	R.C. 5/6	R.C. 12/13	R.C. 20/20	R.C.
Production NH ₃ à partir de l'arginine	6/7	+	0/2	—	N.D.	—	2/2	5/5	1/1	+
Production acétoïne à partir du citrate	0/7	—	0/2	—	N.D.	—	0/2	0/5	0/1	—

		<i>Lactis</i>		<i>Cremoris</i>		<i>Thermophilus</i>		Enterocoques			
			<i>Str. lactis</i>		<i>Str. cremoris</i>		<i>Str. thermophilus</i>	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	<i>Str. faecalis</i>
Croissance à pH 9,6		0/7	—	0/2	—	N.D.	—	0/2	2/5	4/4	+
Activité protéolytique		0.43		N.D.		— 0.25		0.41-0.46	0.42-0.47	0.48-0.67	
Production d'acide à partir de	arabinose	2/8	V	0/1	—	0/1		0/1	1/5	1/9	—
	lactose	8/8	+	0/1	+	1/1	+	1/1	5/5	9/9	+
	maltose	8/8	+	1/1	—	0/1	—	1/1	5/5	8/9	+
	mannitol	1/8	V	1/1	—	1/1	—	1/1	2/5	7/9	+
	saccharose	2/8	V	1/1	—	1/1	+	1/1	5/5	3/9	+
	salicine	2/8	V	1/1	V	0/1	—	0/1	3/5	8/9	+
	sorbitol	0/8	—	0/1	—	0/1	—	1/1	0/5	7/9	+
	tréhalose	7/8	V	1/1	V	1/1		1/1	2/5	8/9	+
Milieu d'isolement :											
	PCA	2/9		2/2				1/6	3/13		
	PCAL	2/9				1/1			1/13	2/20	
	KFS	1/9						1/6	1/13	13/20	
	PTL	3/9							3/13		
	MRS	1/9						3/6	5/13		
	MSA									1/20	
	A.A.									4/20	
	PDA							1/6			
R.C.	= Réduit coagulé		V		Variable			Fraction	nombre de souches positives		
R.nC	Réduit non coagulé		N.D.		Non déterminé				nombre de souches testées		

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les lactobacilles représentent 20 p. 100 de la flore lactique isolée du Vacherin et il est apparu qu'ils peuvent se développer sur des milieux variés autres que le MRS.

Ils sont de faibles producteurs d'acide par comparaison avec les lactobacilles thermophiles, mais comme leur nombre ne cesse de croître au cours de l'affinage du fromage [2] on peut supposer qu'ils ont une action certaine durant la maturation. Leur rôle au sein du fromage serait surtout de protéolyser la caséine (notamment les *Lactobacillus casei*) et de produire des arômes.

Les streptocoques hétérofermentaires sont couramment utilisés en technologie fromagère et notamment pour la maturation de la crème, comme ferments d'arôme.

Ils ont déjà été isolés du fromage de Roquefort [18] où ils participeraient à l'ouverture du caillé, ce qui permettrait le développement des *Penicillium*.

Mais ils peuvent aussi être la cause de défauts de fabrication de fromages. S'ils s'y trouvent en nombre élevé, ils peuvent produire de grandes quantités de gaz pouvant provoquer un gonflement.

L'existence de quelques petits trous dans le Vacherin n'est pas considérée comme un défaut. Elle est certainement due à la présence de leuconostoc qui représentent environ 10 p. 100 des souches lactiques que nous avons isolées.

Ces germes contribuent assurément au goût typique du Vacherin grâce à leur métabolisme hétérofermentaire.

La majeure partie des ferments lactiques du Vacherin se compose de streptocoques homofermentaires, parmi lesquels les streptocoques lactiques parviennent à se développer dans le fromage malgré la forte teneur en sel.

L'absence quasi-totale de streptocoques thermophiles s'explique par la température régnant au cours de la fabrication. La seule souche qui ait été isolée provient d'un fromage produit dans la seule fromagerie où le lait était pasteurisé et inoculé avec un starter de yoghourt.

Les entérocoques sont numériquement les ferments lactiques les plus représentés dans le fromage de Vacherin. Même s'ils n'ont pas un pouvoir protéolytique très grand, on peut penser qu'ils jouent un rôle prépondérant au cours de l'affinage.

La présence d'une flore lactique très diversifiée dans les fromages produits d'une manière traditionnelle et dotés de caractéristiques bien particulières nous conduit à considérer que les starters traditionnels additionnés au lait et composés de 1 ou de 2 souches seulement ne permettent pas de développer les propriétés typiques du fromage.

Résumé

On a étudié les caractéristiques biologiques de 94 souches lactiques isolées au cours de la maturation du fromage « Vacherin Mont-d'Or ».

Les streptocoques fécaux sont prépondérants. Ils sont suivis numériquement par les lactobacilles, notamment des lactobacilles type *plantarum* et quelques lactobacilles type *casei*.

Les leuconostoc sont également bien représentés dans le Vacherin tandis que les streptocoques lactiques homofermentaires (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. thermophilus*), n'atteignent pas 10 p. 100 de la flore totale.

La présence d'une flore très diversifiée dans les fromages traditionnels prouve que les starters traditionnels que l'on ajoute au lait pasteurisé et qui se composent de 1 ou 2 souches spécifiques sont insuffisants pour développer l'arôme et le goût typique des fromages.

Summary

A microbiological study of 94 lactic strains isolated during the ripening of Vacherin cheese was carried out. The faecal Streptococci were prevalent. They were numerically followed by Lactobacilli, mainly *Lactobacillus plantarum* and some *Lactobacillus casei*. The Leuconostoc were also well represented in Vacherin while homofermentative lactic Streptococci (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. thermophilus*) do not reach 10 p. 100 of the total flora.

The presence of a very diversified lactic flora in this traditional cheese indicates that the typical taste and flavour cannot be produced by adding to pasteurized milk traditional starters, containing only one or two specific strains.

Reçu pour publication en janvier 1973.

Bibliographie

- [1] MASSON (A.) (1970). — La flore microbienne du Vacherin Mont-d'Or. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-Untersuchung und Hygiene*, 61, 265.
- [2] SOZZI (T.) et SHEPHERD (D.) (1972). — Evolution de la composition chimique et de la flore microbienne du fromage de Vacherin au cours de la maturation. *Le Lait*, 513, 203-219.
- [3] DE MAN (J. C.), ROGOSA (M.) and SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23, 130.
- [4] GIBSON (T.) and ABD-EL-MALEK (J.) (1948). — Studies in the Bacteriology of milk. I. The Streptococci of milk. *J. Dairy Res.*, 15, 233.

- [5] YEMM (E. W.) and COCKING (E. C.) (1955). — The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst.*, 80, 209.
 - [6] BOTTAZZI (V.) (1959). — Studio sulla microflora del Formaggio Fontina. *Il latte*, 33, 3.
 - [7] OPPENHEIMER (C. H.) and DROST-HANSEN (W. A.) (1960). — A relationship between multiple temperature optima for biological systems and the properties of water. *J. Bact.*, 80, 21-24.
 - [8] LUNDER (T. L.) (1972). — The determination of the configuration of lactic acid produced in milk. *Milchwissenschaft*, 27, (4), 227-230.
 - [9] MATTSO (S.) (1965). — The determination of the configuration of lactic acid in bacterial cultures. Report n° 71, *Milk and Dairy Research Alnarp Sweden*.
 - [10] SOZZI (T.) (1972). — Etude sur la préparation de ferments lactiques très actifs. *Le Lait*, 517, 454.
 - [11] BUTTIAUX (R.), BEERENS (H.) et TACQUET (A.) (1969). — Manuel de techniques bactériologiques 3^e édition. *Editions Médicales Flammarion*.
 - [12] HAUDUROY (P.) (1951). — Techniques bactériologiques. *Masson et Cie Editeurs*, Paris.
 - [13] TRAMER (J.) and FOWLER (G. O.) (1965). — Dosaggio della nisina negli alimenti. *Scienza dell'Alim.*, 31.
 - [14] NIVEN (C. F.), SMILEY (K. L.) and SHERMAN (J. M.) (1942). — The hydrolysis of arginine by Streptococci. *J. Bact.*, 43, 651-660.
 - [15] SWARTLING (P. F.) (1951). — Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting Streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, 256-267.
 - [16] BARRITT (M. M.) (1936). — The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J. Path. Bact.*, 42, 441-454.
 - [17] GARVIE (E. I.) (1960). — The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27, 283-292.
 - [18] DEVOYOD (J. J.) et MULLER (M.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostoc. *Le Lait*, 487, 369, V. les lactobacilles. *Le Lait*, 495, 277.
-