La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru

III. — ROLE DES LEVURES DANS LA MATURATION DE LA « TOME »

par

Liliane MILLET*, Dominique MELCION**
et J. J. DEVOYOD*

INTRODUCTION

Au cours de la « maturation » de la « tome », une des étapes principales dans la fabrication du fromage de Cantal, deux phénomènes distincts, d'origine microbienne, se développent simultanément : une production d'acide et une production de gaz. La production d'acide résulte de l'action des bactéries lactiques et son rôle sur le plan technologique est bien connu. Quant à la production de gaz son rôle est plus difficile à apprécier : elle est souhaitée par les fromagers qui, à tort ou à raison, estiment qu'une tome doit « souffler ». Empiriquement, il est reconnu également « qu'une tome ne souffle qu'une fois » : c'est-à-dire que si la production de gaz est précoce, il y a très peu de chance pour que des fermentations gazeuses ultérieures (gonflements) se produisent dans le fromage.

Au premier stade de la fabrication on trouve dans le fromage de Cantal trois genres microbiens capables de produire du gaz (d'une part, cette production de gaz fait partie de leurs caractéristiques ; d'autre part, au cours des 24 ou 48 premières heures après emprésurage du lait, ils sont susceptibles d'un grand développement) : ce sont les entérobactéries, les levures fermentant le lactose (L.F.L.) et les *Leuconostoc* (Millet et Devoyod, 1974).

Nous avons plus particulièrement étudié le rôle des L.F.L., parce que, dans les « bonnes » maturations de « tome », une odeur de levure est très souvent observée.

* Laboratoire de Recherches Fromagères (I.N.R.A.) - 15000 Aurillac.

** Laboratoire de Bactériologie Laitière (I.N.R.A.) - 78350 Jouy-en-Josas.

MATERIEL ET METHODES

I. — DENOMBREMENT ET IDENTIFICATION DES L.F.L.

Les techniques étudiées pour le dénombrement des L.F.L. ont été décrites antérieurement (Millet et *al.*, 1974) : nous opérons en deux temps : dénombrement des levures sur milieu à la pomme de terre puis recherche des L.F.L. par culture sur lactosérum. Les critères d'identification des levures sont ceux de Lodder (1970).

II. — PRODUCTION DE GAZ PAR LES L.F.L.

1) Souches microbiennes

Pour l'étude des conditions de production de gaz, trois souches de L.F.L. ont été utilisées. *Saccharomyces fragilis* 1, *Sacch. lactis* 310 et *Torulopsis sphaerica* 9.

Les caractéristiques biochimiques de ces souches ainsi que leur action vis-à-vis des micro-organismes de la flore des laits crus ont été décrites antérieurement. (Devoyod et Sponem, 1971 ; Desmazeaud et Devoyod, 1974 ; Devoyod et Muller, 1969 ; Devoyod et Desmazeaud, 1971).

2) Mesure de la production de gaz

a) PRÉPARATION DES CULTURES

100 ml de lactosérum de fromagerie (pH 6,0) stérilisé par filtration sur filtre Seitz EKS étaientensemencés à 1 p.100 avec une culture de levure de 48 h sur ce même milieu. Après 48 h à 22° C au bain-marie agité, les cultures étaient centrifugées puis lavées une fois avec une solution de Ringer au 1/4 stérile et recentrifugées.

Le culot de centrifugation était remis en suspension dans environ 100 ml de solution de Ringer au 1/4 stérile. La teneur en levure de ces suspensions était appréciée par dénombrement sur gélose à la pomme de terre (Potato Dextrose Agar Difco n° 13).

b) TECHNIQUES RESPIROMÉTRIQUES

La mesure de production de CO₂ a été effectuée au respiromètre différentiel Gilson G. 14 en utilisant la méthode manométrique directe de Umbreit et *al.* (1964). Toutes les expériences ont été

effectuées à 30° C. La production de CO₂ était mesurée à intervalles réguliers.

c) SUBSTRATS UTILISÉS

Tampons : pour apprécier l'action du pH sur la production de CO₂ par les levures, nous avons utilisé deux tampons : le tampon au cacodylate de sodium et le tampon au phtalate acide de potassium en couvrant une gamme de pH de 7,0 à 4,5. Cette gamme englobe les variations de pH que l'on observe au cours de l'acidification du caillé par les levains lactiques. Le choix des tampons a été dicté par le fait que les levures fermentant le lactose sont capables de métaboliser les acides organiques ; de ce fait il nous était impossible d'utiliser des tampons du type acide acétique-acétate de sodium par exemple.

Sucres : pour préciser par quelle voie métabolique les levures produisaient du gaz, nous avons utilisé comme substrat le lactose et ses deux constituants le glucose et le galactose. Les solutions aqueuses de ces sucres étaient stérilisées par filtration sur filtre Seitz EKS. Différentes concentrations ont été utilisées, elles sont précisées dans les résultats.

Sel : l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la production de CO₂ a été également étudiée. Cette action est importante à connaître car dans la technologie du fromage de Cantal, le sel est incorporé à la tome brisée, avant le montage de la « fourme ».

Les solutions de ClNa étaient stérilisées par filtration sur filtre Seitz EKS.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. — IDENTIFICATION DES LEVURES

Sur 38 souches de levures isolées au cours des premiers stades de la fabrication du fromage de Cantal, 20 (soit 53 p.100) fermentaient le lactose.

D'après leur possibilité de former, ou non, des ascospores et leur pouvoir d'assimiler et de fermenter les sucres, on a pu classer les L.F.L. isolées comme suit : *Torulopsis sphaerica* (six souches), *Saccharomyces lactis* (douze souches) et *Sacch. fragilis* (deux souches).

On a donc retrouvé les mêmes espèces que dans d'autres fromages fabriqués à partir de lait cru (Devoyod et Sponem, 1970).

Les levures qui ne fermentaient pas le lactose appartenaient aux genres *Pichia* et *Rhodotorula*.

II. — PRODUCTION DE GAZ PAR LES L.F.L.

1) Influence du pH

Sur la figure 1, on a porté les quantités de gaz produites à différents pH (de 4,5 à 7,0) par les trois souches de levures. La production

fig. 1

Action du pH sur la production de gaz par les levures

- — ■ *Torulopsis sphaerica* 9
- — ○ *Saccharomyces fragilis* 1
- * — * *Saccharomyces lactis* 310

maximum de CO₂ se situe dans une zone de pH voisine de 5,0 mais cette production est encore importante à pH 6,0. Au point de vue technologique, on trouve durant la maturation de la tome, les conditions optima de production de CO₂ par les L.F.L.

2) Influence de la nature du sucre

Dans le tableau 1 sont indiquées les quantités de gaz produites par les trois souches de levures à partir du lactose, du galactose et du mélange en quantités égales de glucose et de galactose.

TABLEAU 1

Influence de la nature du sucre sur la quantité de gaz produite par les levures
(les valeurs données correspondent aux quantités de CO₂,
exprimées en µl, produites après 1 h à 30° C à pH, 5,0)

Sucres	<i>Sacch. fragilis</i> 1	<i>Sacch. lactis</i> 310	<i>T. sphaerica</i> 9
Lactose 1 p. 100	268	216	254
Glucose 0,5 p. 100	100	101	116
Glucose 1 p. 100	122	116	139
Galactose 0,5 p. 100	62	33	42
Galactose 1 p. 100	71	73	69
Glucose 0,5 p. 100 + Galactose 0,5 p. 100	91	95	106
Glucose 1 p. 100 + Galactose 1 p. 100	147	102	152

On constate que la quantité de CO₂ produite à partir du lactose est plus grande que les quantités produites à partir du glucose et du galactose. Si l'on donne à la quantité de CO₂ produite à partir du lactose la valeur 100, la quantité produite à partir du mélange glucose plus galactose est respectivement de 55, 47 et 60 pour les trois souches de levure.

Nos résultats confirment ceux trouvés antérieurement par Rogosa (1948). Selon cet auteur l'hydrolyse enzymatique du lactose en ses deux constituants ne serait pas nécessaire pour la fermentation du lactose par les levures.

3) Influence de la concentration en sucre

On a porté sur les figures 2, 3 et 4 les courbes de production de CO_2 par *Sacch. lactis* 310, *Sacch. fragilis* 1 et *T. sphaerica* 9 en fonction de différentes concentrations en lactose. On voit que la production de CO_2 par ces levures augmente en même temps que la concentration en sucre ; lorsque la teneur en lactose est inférieure à 0,2 p. 100, la production de gaz diminue de façon sensible.

fig. 2

Action de la concentration en lactose sur la production de gaz
par les *Saccharomyces lactis* 310

Quantité de cellules : 30×10^7

fig. 3

Action de la concentration en lactose sur la production de gaz
par *Saccharomyces fragilis* 1
Quantité de cellules : 17×10^7

Dans le fromage de Cantal, lors de maturations correctes de la tome, on a trouvé, 24 h après l'emprésurage du lait, des teneurs en lactose inférieures à 0,1 p. 100 (Didienne, 1973). Des résultats semblables ont été trouvés par Taylor (1970) sur des fromages Cheddar. Cette fermentation du lactose (sous forme de CO₂ par les L.F.L.)

fig. 4

Action de la concentration en lactose sur la production de gaz
par *Torulopsis sphaerica* 9

Quantité de cellules : 20×10^7

diminue les risques de gonflement après pressage. Autrement dit la tome « souffle » en fermentant le lactose. C'est la raison pour laquelle lorsque la fermentation se déroule normalement elle ne « souffle » qu'une fois.

4) Influence de la concentration en sel

Dans le tableau 2, on a porté les quantités de gaz produites par les trois souches de levures à partir du lactose en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium.

TABLEAU 2

Influence de la concentration en sel sur la quantité de gaz produite par les levures

(les valeurs données correspondent aux quantités de CO₂, exprimées en µl, produites après 1 h à 30° C à pH 5,0)

Teneur en ClNa	<i>Sacch. fragilis</i> 1	<i>Sacch. lactis</i> 310	<i>T. sphaerica</i> 9
0 p. 100	335	415	416
0,5 p. 100	364	458	426
1 p. 100	382	452	404
2 p. 100	340	392	407
3 p. 100	292	330	377
4 p. 100	208	292	362
5 p. 100	98	228	316

On voit qu'en présence de faibles concentrations en sel (0,5 à 1 p. 100) la production de gaz de *Sacch. lactis* 310, de *Sacch. fragilis* 1 augmente mais qu'il n'en est pas de même pour celle de *T. sphaerica* 9. Pour des concentrations en sel supérieure à 3 p. 100 la production de gaz diminue ; cette diminution est nettement plus marquée pour les souches de *Saccharomyces* que *T. sphaerica* 9. Il est intéressant de comparer ce résultat avec la résistance de ClNa de ces souches déterminée au laboratoire (Devoyod et Melcion, 1970). Alors que *T. sphaerica* se développait dans un milieu contenant 7,5 p. 100 de ClNa, *Sacch. lactis* et *Sacch. fragilis* ne s'y développaient pas.

Sur le plan technologique, le salage de la tome (après passage au moulin « brise-tome ») ne peut donc guère être un facteur limitant de la production de gaz par les L.F.L. puisque les quantités de sel

utilisées sont inférieures aux quantités qui diminuent la production de CO_2 .

III. — *ROLE DES L.F.L. DANS LA MATURATION DE LA TOME*

Au cours de la « maturation » de la tome, les L.F.L. trouvent des conditions optimales pour produire du CO_2 à partir du lactose. Dans la flore des laits crus, on trouve de nombreux micro-organismes capables de fermenter le lactose en donnant des produits dépréciant la qualité du fromage : en éliminant en partie le lactose pendant la maturation de la tome les L.F.L. empêchent ces micro-organismes d'agir.

Certes le lactose est éliminé aussi sous forme d'acide lactique mais la fermentation lactique ne doit pas être trop poussée si l'on veut garder au fromage de Cantal ses caractéristiques de texture traditionnelles. L'élimination du lactose par les L.F.L. sous forme de CO_2 représente sans doute le meilleur moyen pour atteindre naturellement à cet objectif. Nous avons constaté qu'il existait une très bonne corrélation entre la « maturation » de la tome avec développement et activité des L.F.L. et la qualité du fromage. La démonstration de notre hypothèse consistera à utiliser des L.F.L. sous forme de levains dans des fabrications de Cantal à partir de lait cru de très bonne qualité bactériologique. Ce sont des essais que nous envisageons de faire dans un proche avenir.

Enfin les L.F.L. sont capables d'excréter dans le lait des substances de croissance de type vitaminique (Devoyod et Desmazeaud, 1971). Il est vraisemblable que ces substances ont une action sur le développement des streptobactéries auquel on assiste dans une phase ultérieure de la maturation du fromage.

Résumé

Les levures fermentant le lactose (L.F.L.) que l'on trouve au cours des premiers stades de la fabrication du fromage de Cantal ont été étudiées ainsi que différents paramètres ayant une action sur la production de gaz par ces levures. En éliminant une partie du lactose sous forme de CO_2 , les L.F.L. exerceraient un double rôle : empêcher les fermentations gazeuses indésirables au cours du pressage du fromage et conserver la texture traditionnelle du fromage de Cantal. Les L.F.L. contribuent en outre au développement ultérieur des streptobactéries.

Summary

THE MICROBIAL FLORA OF CANTAL CHEESE MADE WITH RAW MILK

*Role of the yeasts in the ripening of the « Tome »
(pressed curd)*

During the first steps of the cheese making process, yeasts have been isolated from the curd and studied. Many of those yeasts were able to ferment lactose. Lactose fermenting yeasts (L.F.Y.) ferment lactose more quickly than glucose and galactose.

The action of pH, sugar concentration and salt concentration on gaz production have been studied by manometric methods.

L.F.Y. will play a two-fold role during the ripening of the curd ; they will prevent the blowing of the cheese in the press and they will contribute indirectly to the desired texture of the curd.

Remerciements

Nous remercions vivement MM. Mocquot et Auclair pour leurs suggestions et leurs critiques.

Bibliographie

- [1] DESMAZEAUD (M.) et DEVOYOD (J. J.) (1974). — Mise en évidence et caractérisation partielle de différentes peptidases chez *Saccharomyces lactis*. *Ann. Biol. anim. bioch. Biophys.*
- [2] 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.
- [3] DEVOYOD (J. J.) et SPONEM (D.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Le Lait*, 498, 254.
- [4] 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.
- [5] DIDIENNE (R.) (1973). — Résultats non publiés.
- [6] LODDER (J.) (1971). — The yeasts : a taxonomic study. *North Holland Publishing Co*, Amsterdam.
- [7] MILLET (L.), MELCION (D.) et DEVOYOD (J. J.) (1974). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. I. Techniques d'étude et résultats préliminaires. *Le Lait*.
- [8] MILLET (L.) et DEVOYOD (J. J.) (1974 a). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. IV. Son évolution au cours de la fabrication et l'affinage. *Le Lait*.
- [9] MILLET (L.) et DEVOYOD (J. J.) (1974 b). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. V. Les streptobactéries. *Le Lait*.
- [10] ROGOSA (M.) (1948). — Mechanism of the fermentation of lactose by yeasts. *J. Biol. Chem.*, 175, 413.
- [11] TAYLOR (G. C.) (1970). — A rapid enzymatic method for the determination of lactose in cheese. *Australian J. Dairy Technol.*, 25, 7.
- [12] UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) and STAUFFER (J. F.) (1964). — Manometric techniques : 4th ed. *Burgess Publishing Co*, Minneapolis.