Etudes chimiques et microbiologiques sur la maturation de fromages persillés. Influence de la flore microbienne selon différentes technologies*

par

G. OTTOGALLI, B. BIANCHI-SALVADORI, A. GALLI, L. CECCHI,
P. RESMINI et G. VOLONTERIO

*Istituto di Microbiologia agraria e di Industrie agrarie dell'Università di Milano,
Centro Sperimentale del Latte di Milano*

Dans une précédente étude nous avons tracé le cadre de la maturation du Gorgonzola dans ses phénomènes chimiques et microbiologiques fondamentaux [1]. A cette occasion nous avons essayé de mettre en relation les modifications des principaux composants du fromage avec la microflore trouvée aux différents moments de la maturation ; au sein de la microflore présente, on avait reconnu l'importance prépondérante des *Penicillium*, des bactéries lactiques, ainsi que de la microflore de la croûte. Dans cette seconde phase de la recherche nous avons essayé de vérifier le cadre biochimique de la maturation et d'approfondir le rôle effectif tenu par les trois principaux groupements microbiens lorsqu'ils sont mis en mesure d'agir isolément l'un de l'autre. A cet effet, des formes expérimentales ont été prévues, et précisément :

- 1) Sans *Penicillium*.
- 2) Sans « starters ».
- 3) Sans croûte.

Ces formes ont été examinées sous le profil chimique et microbiologique au cours de la maturation, et comparées avec du Gorgonzola témoin. Même en tenant compte du fait qu'avec la méthodologie adoptée, la succession typique de la microflore est troublée et par suite les fromages étudiés sont très différents du Gorgonzola, les résultats obtenus ont servi dans certains cas à confirmer et dans d'autres cas à élucider certaines des hypothèses qui avaient été formulées lors d'une précédente étude [1].

* Etude effectuée avec le concours du C.N.R.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Les formes faisant l'objet de la recherche ont été obtenues par des traitements industriels effectués suivant la technologie normale [2], à partir de lait pasteurisé. Les modifications sont indiquées dans la description de chaque essai.

Formes sans croûte (SC) : les formes ont été réalisées suivant la technologie normale ; on a essayé d'empêcher la formation de la croûte en enveloppant les formes avec une feuille de parafilm qui a été périodiquement enlevée pour faciliter la disparition du sérum.

Formes sans ferments lactiques thermophiles (SF) : les formes ont été produites suivant la technologie normale, mais sans ajouter de ferments lactiques.

*Formes sans inoculation de *Penicillium* (SP)* : les formes ont été produites sans l'adjonction de spores de *Penicillium* au lait et sans effectuer le piquage à 15 j de manière à obtenir des formes exemptes de persillé.

Témoin (C) : pour chaque essai, à partir du même lait, des formes de contrôle ont été préparées en procédant selon la technologie standard.

Méthodes

MÉTHODES CHIMIQUES

En ce qui concerne les déterminations chimiques traditionnelles relatives à la substance sèche, pH, lactose, acidité, N total, N soluble à pH 4,6 et N ammoniacal, on peut se reporter à la précédente étude [1]. N soluble dans l'eau : comme indiqué par Savini [3] ; N caséine soluble : calculée comme différence entre N non soluble dans l'eau et N soluble à pH 6.

Extraction des caséines et séparations électrophorétiques : suivant les indications contenues dans une autre étude [4].

Séparation et extraction des amino-acides libres : avec analyseur automatique, comme indiqué dans une autre étude [4, 5]. Méthylcétones : extraction, conversion en 2,4-DNP-hydrzones et leur purification suivant la technique indiquée par Schwartz et al. [6, 7] ; analyse gaz chromatographique des hydrzones suivant Kallio [8]. Acides gras libres : suivant la technique indiquée par Kaderavek et Volonterio [9]. Amines volatiles : extraction, purification et leur conversion en hydrochlorhydrates en adoptant la technique indiquée par Tokita [10] ; transformation en benzoil-dérivés et leur analyse gaz chromatographique comme indiqué par Gasco et Barrera [11].

MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES

Les examens microbiologiques ont été effectués par prélèvement d'une abondante portion de la forme (200-300 g) ; le fromage prélevé a été additionné de sel tryptone comme diluant, à raison de 1:6 et soumis à homogénéisation en appareil Ultraturrax à 20 000 t/mn. Les déterminations suivantes ont été effectuées :

Bactéries non lactiques en gélose, incubation à 32° C pendant 48 h et à 20° C pendant 4 j.

Coliformes en désoxycholate lactose agar en double couche ; incubation à 32° C pendant 18-24 h.

Bactéries lactiques : lactiques mésophiles en sérum gélosé de lait [12] et lait stérilisé, incubation à 10° C pendant 5-10 j.

Bactéries lactiques « totales » en sérum gélosé de lait et lait stérilisé, incubation à 30° C pendant 2-5 j.

Bactéries lactiques thermophiles en sérum gélosé de lait et lait stérilisé, incubation à 45° C pendant 2-5 j.

L'incubation des plaques de sérum à 30° C a été effectuée en atmosphère de N₂ et Co₂ 95 + 5 p. 100.

A partir des plaques d'agar sérum et de lait il a été procédé, avec examens microscopique et biochimique, à l'identification des espèces selon Sharpe et Fryer [13].

Leuconostoc en agar Mayeux [14], incubation à 22° C pendant 5-8 j. Identification des espèces selon Garvie [15].

Entérocoques en milieu liquide de Rothe, incubation à 37° C pendant 36-48 h, et par suite confirmation en milieu de Litsky à 37° C pendant 36-48 h et différenciation par étalement sur milieu de Barnes à 37° C pendant 36-48 h. Identification des espèces suivant Barnes [16].

Levures et moisissures en agar OGA [17], incubation à 20° C pendant 5 j.

RESULTATS

Données technologiques et examen organoleptique

Les données technologiques des traitements figurent dans le tableau 1. En ce qui concerne l'examen organoleptique, celui-ci a été effectué à la fin de la maturation pour chaque forme expérimentale par rapport au témoin respectif.

Formes de témoin : ces formes ont toutes montré un aspect normal de la pâte ; des détachements réguliers avec un persillage uniforme, un goût et des odeurs caractéristiques sans défauts.

Forme sans croûte : pâte élastique peu protéolysée. Goût légèrement plus acidulé que le contrôle avec tendance au goût amer, à

TABLEAU 1

Données technologiques des traitements de témoin C, sans croûte (SC), sans *Penicillium* (SP) et sans starters (SF)

	C, SC, SP	SF
Quantité lait	500 l	500 l
Acidité du lait	17 Dornic	17 Dornic
Quantité starters	2 p. 100	—
Acidité starters	128 Dornic	—
T° pasteurisation	72° C	72° C
Acidité mélange lait + starters	19 Dornic	17 Dornic
Titre de la présure	10 000	10 000
Quantité de présure	40 ml/100 l	40 ml/100 l
T° emprésurage	29° C	30° C
<i>Penicillium</i> ajouté	souche NO-C (10 ml/100 l)	souche NO-C (10 ml/100 l)
Coagulation après	17 mn	29 mn
Premier brassage	avec « spada »	avec « spada »
Acidité sérum	12 Dornic	11 Dornic
Arrêt	18 mn	28 mn
Deuxième brassage	avec « spannarola »	avec « spannarola »
Acidité sérum	13 Dornic	11 Dornic
Durée traitement	48 mn	65 mn
Chauffage 20° C - 22° C	24 h	24 h
Salage	à sec	à sec
T° locaux affinage	+ 5° C	+ 5° C
Humidité locaux affinage	90 p. 100	90 p. 100
Piquage (pas pour SP)	15 gg	15 gg
Durée affinage	60 gg	60 gg
Rendement après affinage	kg 12,3 p. 100	11,8 p. 100

attribuer probablement à un égouttement insuffisant. *Penicillium* assez bien développé et persillage normal. La croûte caractéristique ne s'est pas formée.

Forme sans « starters » : pâte élastique, crémeuse, bien égouttée, goût légèrement amer, ouverture accentuée, développement de *Penicillium* légèrement supérieur au témoin.

Forme sans « Penicillium » : pâte très compacte, sèche, crayeuse. Goût nettement plus acide que le contrôle ; dans l'ensemble l'aspect et le goût rappellent ceux du « Taleggio ».

Résultats chimiques

Dans le tableau 2 figurent les valeurs moyennes de pH et d'acidité titrable évaluées sur la masse du fromage. Le tableau 3 indique les valeurs constatées avec détermination stratigraphique. On note que le contrôle et le fromage SF se comportent de la

TABLEAU 2

Analyses chimiques à 30 et 60 j de maturation effectuées sur les échantillons : sans croûte (SC), sans starters (SF), sans *Penicillium* (SP) et témoin (C). Résultats pour 100 g de matière sèche

	SC		SF		SP		C	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
Matière sèche	49,92	50,00	50,42	50,61	52,64	54,19	51,51	51,94
pH moyen	5,45	5,58	5,64	6,25	5,40	5,47	5,51	6,21
Lactose	1,70	0,00	1,34	0,00	1,09	0,00	0,96	0,00
Acidité (p. 100 ac. lactique)	1,81	1,52	1,38	0,95	1,75	1,74	1,64	1,26
N total	5,62	5,88	5,80	5,86	5,93	5,94	5,96	5,91
N soluble pH 4,6	1,02	1,38	0,72	1,45	0,87	1,30	1,47	2,03
N soluble H ₂ O	1,49	1,93	1,88	2,57	1,35	1,50	1,98	2,78
N ammoniacal	0,011	0,034	0,006	0,052	0,010	0,028	0,009	0,051
N caséine solubilisé	0,47	0,45	1,16	1,12	0,48	0,20	0,51	0,75
N caséine solubilisé								
p. 100	31,50	23,31	61,70	43,57	35,55	13,33	25,75	26,97
N soluble H ₂ O								

TABLEAU 3

Détermination stratigraphique du pH avec électrode dans le fromage
(valeurs moyennes) après 30 j et 60 j d'affinage.

Témoin (C), sans croûte (SC), sans *Penicillium* (SP), sans starters (SF)

	C		SC		SP		SF	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
Quelques cm de la croûte	6,0	6,8/7	5,0	6,5	5,5	5,8	6,0	6,8/7
Centre	5,0	6,2/7	5,0	6,2/6,5	5,2	5,4	5,0	6,2/7

même façon : alors que le pH au centre de la forme à 30 j est à peu près celui du caillé, près de la croûte il s'avère moins acide à cause de l'action de la microflore superficielle ; à 60 j le pH ne varie plus dans le sens stratigraphique, mais apparaît hétérogène par rapport à la distribution de la moisissure arrivant à des valeurs proches de la neutralité dans les parties persillées et des valeurs de pH inférieures dans les portions non persillées. La forme SC dans laquelle, en l'absence de la microflore de la croûte, l'action désacidifiante est due exclusivement au *Penicillium*, présente un pH plus bas que le contrôle et surtout sans variations entre la périphérie et le centre. Les formes SP sont celles qui restent plus acides : en effet dans ce cas l'action désacidifiante n'est exercée que par la microflore de la croûte.

Le lactose (tab. 2) est encore présent dans la forme de 30 j de maturation, mais est totalement absent dans celles de 60 j. La valeur élevée constatée dans la forme SC à 30 j doit être attribuée à l'égouttement plus faible de cette forme.

L'azote soluble (tab. 2) dans l'eau est plus élevé dans l'échantillon SF, avec une valeur similaire à celle du contrôle, tandis qu'il l'est moins dans SP et SC ; dans le premier cas il manque en effet l'action du *Penicillium*, et dans le deuxième celui de la microflore de la croûte.

La quantité de caséine soluble (qui peut être mise en rapport avec la consistance de la pâte, étant donné que ce qui contribue à rendre le fromage mou est la disgrégation du phospho-caséinate), est plus élevée dans SF (pâte crémeuse), tandis qu'elle est plus faible dans SP (pâte crayeuse). En analysant le rapport en pourcentage d'azote caséine solubilisée/azote soluble dans l'eau, nous constatons

TABLEAU 4. — Composition en acides aminés libres du lyophilisé écrémé : mg/100 de lyophilisé écrémé

	Sans croûte		Sans starters		Sans <i>Penicillium</i>		Témoin	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
Acide aspartique	44,6	49,6	8,6	36,0	27,3	45,9	26,3	78,6
Thréonine	40,1	52,6	0,8	20,1	35,3	65,8	23,8	56,6
Sérine	63,5	61,0	2,3	28,5	49,1	61,8	33,8	62,6
Asparagine + Glutamine	244,8	299,0	8,0	111,7	201,5	342,7	146,7	291,4
Proline	87,1	102,6	3,6	62,0	67,6	126,2	59,0	172,0
Acide glutamique	30,9	109,4	22,9	157,3	39,4	74,4	31,6	295,1
Cystine	5,6	12,4	3,1	5,7	4,4	13,0	5,0	15,3
Glycine	28,7	36,9	2,2	21,2	21,0	43,2	16,3	47,7
Alanine	62,4	87,6	13,1	54,6	50,5	65,7	50,5	92,7
— NH ₂ butyrique		+		3,5	+			
Valine	99,1	140,7	7,8	64,5	73,0	137,4	75,9	151,3
Méthionine	43,4	58,9	2,0	28,8	36,5	62,6	28,5	67,3
Isoleucine	39,6	69,5	3,8	38,7	31,6	68,6	31,1	94,4
Leucine	250,7	367,5	19,6	132,1	199,8	364,4	193,1	321,9
Tyrosine	73,7	125,8	6,2	44,6	55,3	95,0	59,2	139,2
Phénylalanine	160,2	239,9	20,7	97,1	142,0	202,2	134,0	212,4
— NH ₂ butyrique	159,6	152,4	3,1	14,8	120,1	214,7	94,9	63,3
Ornithine	58,8	87,4	10,9	13,7	42,7	68,4	47,0	89,5
NH ₃	29,7	91,7	16,5	140,6	26,7	76,2	25,2	174,8
Lysine	110,2	208,1	7,3	118,7	108,5	208,3	74,1	302,2
Histidine	1,9	16,8	1,5	39,4	6,5	28,0	4,2	91,5
Arginine	81,7	133,5	3,7	71,2	85,7	128,2	59,7	95,9
Somme	1716,3	2503,6	167,7	1304,8	1424,7	2492,7	1219,9	2915,6

TABLEAU 5. — Composition en acides aminés libres du lyophilisé écrémé.
Les valeurs sont les mêmes du tableau 4, mais exprimés en p. 100 de partie peptidique

	Sans croûte		Sans starters		Sans <i>Penicillium</i>		Témoin	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
Acide aspartique	2,60	1,99	5,13	2,76	1,95	1,84	2,16	2,69
Thréonine	2,34	2,10	0,48	1,54	2,48	2,64	1,95	1,94
Sérine	3,70	2,44	1,37	2,18	3,45	2,48	2,77	2,15
Asparagine + Glutamine	14,26	11,94	4,77	8,56	14,14	13,75	12,02	9,99
Proline	5,07	4,10	2,15	4,75	4,74	5,06	4,84	5,90
Acide glutamique	1,80	4,37	13,65	12,06	2,76	2,98	2,59	10,12
Cystine	0,33	0,49	1,85	0,44	0,31	0,52	0,41	0,52
Glycine	1,67	1,47	1,31	1,62	1,47	1,73	1,34	1,64
Alanine	3,63	3,50	7,81	4,18	3,54	2,64	4,14	3,18
— NH ₂ butyrique	—	+	—	0,27	+	—	—	—
Valine	5,77	5,62	4,65	4,94	5,12	5,51	6,22	5,19
Méthionine	2,53	2,35	1,19	2,21	2,56	2,51	2,34	2,31
Isoleucine	2,31	2,78	2,26	2,96	2,22	2,75	2,55	3,23
Leucine	14,61	14,68	11,69	10,12	14,02	14,62	15,83	11,04
Tyrosine	4,29	5,02	3,70	3,42	3,88	3,81	4,85	4,77
Phénylalanine	9,33	9,58	12,34	7,44	9,97	8,11	10,98	7,29
— NH ₂ butyrique	9,30	6,09	1,85	1,13	8,43	8,61	7,78	2,17
Ornithine	3,42	3,49	6,50	1,05	3,00	2,74	3,85	30,7
NH ₃	1,73	3,66	9,84	10,77	1,87	3,06	2,06	5,99
Lysine	6,42	8,31	4,35	9,10	7,61	8,36	6,07	10,37
Histidine	0,11	0,67	0,89	3,02	0,46	1,12	0,34	3,14
Arginine	4,76	5,33	2,22	5,46	6,01	5,14	4,89	3,29

que dans les échantillons témoins il représente une valeur constante aussi bien à 30 j qu'à 60 j (26-27 p.100).

Dans les autres échantillons ce pourcentage varie pendant l'affinage, ce qui peut être considéré comme un indice d'irrégularité dans l'évolution de la maturation. Les tableaux 4 et 5 indiquent les données relatives aux amino-acides libres.

On peut remarquer que, alors que dans les échantillons SC et SP les valeurs des amino-acides sont à peu près les mêmes que dans les contrôles, pour SF ces valeurs sont nettement inférieures, ce qu'il faut attribuer à une activité protéolytique insuffisante et de toute façon différente de la part des lactiques mésophiles. Si l'on examine chacun des amino-acides séparément, l'on obtient confirmation des observations figurant dans une précédente note [17] : dans le témoin (C) l'on a une augmentation constante d'acide glutamique et de lysine et une diminution d'acide γ -amino-butyrique. Pour l'acide glutamique il se vérifie une augmentation, dans le témoin, de 2,59 p.100 à 30 j à 10,12 p.100 à 60 j, tandis que dans l'échantillon SF les valeurs sont toujours élevées et dans l'échantillon SP toujours faibles. Dans le contrôle l'acide γ -amino-butyrique présente une forte diminution ; dans l'échantillon SF les valeurs

fig. 1

Electrophorégrammes (géluse de polyacrilamide) de caséines extraites de différents fromages après 30 j d'affinage : sans croûte (SC), sans starters (SF), sans *Penicillium* (SP), témoin (C).

restent basses aussi bien à 30 j qu'à 60 j, et dans SP les valeurs sont élevées à 30 j comme à 60 j. Il semble donc que les lactiques thermophyles soient en mesure d'accumuler des quantités considérables de cet amino-acide (ce qui s'accorde avec les données fournies par Salvadori [18] sur l'activité *in vitro* de *L. bulgaricus*). Par la suite, cet amino-acide est utilisé ultérieurement, mais seulement si le *Penicillium* est présent. Dans les figures 1-2 sont indiqués les tracés électrophorétiques des différents fromages ; il est possible de cette façon d'observer le tracé du Gorgonzola à 60 j dans lequel l'accumulation de produits de dégradation dans la zone de la γ -caséine est caractéristique. Comme cette dégradation manque dans le tracé de SP, tandis qu'elle est présente, bien que dans une plus faible mesure, dans SC et SF, on peut conclure que cette action est due au *Penicillium* ; une preuve en est donnée par la comparaison de ce tracé avec celui du fromage Grana [19] où la protéolyse est due aux bactéries lactiques, avec accumulation de ces produits de dégradation dans la zone de la γ mais non de la γ -caséine. Il faut noter que la β -caséine n'apparaît nettement attaquée que dans le contrôle, et par conséquent seulement dans le cas où sont présents tous les groupements microbiens. Enfin la caséine α_s apparaît dégradée dans

fig. 2

Electrophorégrammes (géluse de polyacrilamide) de caséines extraites de différents fromages après 60 j d'affinage : sans croûte (SC), sans starters (SF), sans *Penicillium* (SP), témoin (C).

une plus forte mesure, dans l'ordre par les moisissures, les lactiques, et la microflore de la croûte.

L'analyse du tableau 6 fait ressortir la présence de nombreuses amines aussi bien à 30 j qu'à 60 j de maturation, parmi lesquelles la di-iso-propyle et la di-iso-butyle-amine qui tendent à augmenter au cours de la maturation, et l'éthyle-amine qui au contraire subit une certaine diminution.

TABLEAU 6

Quantité approximative de quelques amines déterminées comme benzoyl-dérivés en 4 échantillons de fromage : sans croûte (SC), sans starters (SF), sans *Penicillium* (SP), témoin (C), après 30 j et 60 j d'affinage

Amines	SC		SF		SP		C	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
Ethyl	+++	—	+++	—	—	—	++	—
Propyl	++	tr	++	++	+++	—	+	+
Diisopropyl	+	++	++	+++	+++	+++	++	+++
+ isobutyl	++	+	+	+	—	tr	+	+
Dipropyl	++	++	+	+	—	++	++	++
Diisobutyl	+	+	+	+	+	++	++	++
Hexyl	+	++	+	+	tr	+	+	+

+ = 5 p. 100
 ++ = 20 p. 100
 +++ = 40 p. 100

Dans le tableau 7 on peut observer le comportement des acides gras volatils ; en termes généraux on note une diminution en pourcentage de l'acide acétique, et une augmentation de l'acide butyrique, en relation avec l'activité protéolytique, et surtout lipolytique des *Penicillium* et de la microflore de la croûte, ce qui est d'ailleurs confirmé par le fait que dans SC et surtout dans SP les valeurs de C_4 restent beaucoup plus basses que dans le contrôle. Le contenu en méthyle-cétones indiqué dans le tableau 8 met en relief l'importance en pourcentage de C_5 et C_7 au terme de la maturation ; dans le fromage entre 30 j et 60 j on note une diminution des méthyle-cétones C_9 et C_{11} et une augmentation des C_3 , C_5 et C_7 .

Résultats microbiologiques

Les résultats microbiologiques figurent dans les tableaux 9, 10 et 11 avec les commentaires correspondants.

TABLEAU 7

Quantité de quelques acides gras volatils libres en 4 échantillons de fromage : sans croûte (SC), sans starters (SF), sans *Penicillium* (SP), témoin (C), après 30 j et 60 j d'affinage (valeurs en p. 100)

Acides gras	SC		SF		SP		C	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
C ₂	89,97	64,06	85,48	34,48	83,77	64,67	74,80	27,59
C ₃	2,38	2,68	1,09	2,03	2,44	1,57	4,08	1,70
C ₄ iso	1,03	2,78	2,66	8,74	2,65	5,18	4,28	5,80
C ₄	5,97	17,84	6,82	41,30	7,17	14,75	8,05	51,54
C ₅ iso	0,63	12,64	3,95	13,45	3,96	13,85	8,78	13,47

TABLEAU 8

Quantité de quelques méthyle-cétones déterminés comme 2-4 DNP hydrazones en 4 échantillons de fromage : sans croûte (SC), sans starters (SF), sans *Penicillium* (SP), témoin (C), après 30 j et 60 j d'affinage (valeurs en p. 100)

Méthyle-cétones	SC		SF		SP		C	
	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j	30 j	60 j
C ₃	4,01	21,67	8,36	15,71	24,63	10,62	7,64	15,04
C ₅	11,17	31,02	15,08	38,35	39,04	37,86	18,08	39,04
C ₇	20,04	44,65	19,74	29,63	31,38	47,28	22,64	35,59
C ₉	30,17	1,27	31,23	10,95	2,50	2,04	28,06	6,58
C ₁₁	30,61	1,39	25,50	5,35	2,44	2,19	23,57	3,74

Le fromage SC à la fin de la maturation s'est révélé bien persillé par des *Penicillium roqueforti* var. *weidemannii*. Les levures sont présentes à de faibles valeurs. La croûte caractéristique ne s'est pas développée, mais à certains endroits on a remarqué la présence d'une patine due à des bactéries psychotrophes gram — qui cependant se sont avérées métaboliquement inertes et par suite non en mesure d'influencer le biochimisme des couches inférieures. Il est apparu que la microflore lactique était constituée principalement de formes thermophiles de starter, et dans une quantité inférieure de mésophiles du lait (*Str. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*,

TABLEAU 9

Nombre de micro-organismes/g de pâte au cours de la maturation.
Echantillons : sans croûte (SC) et témoin correspondant

Micro-organismes			Temps de prélèvement					
			après salage		30 j		60 j	
			SC	C	SC	C	SC	C
Bactéries non lactiques	totales		9X10 ⁷	9X10 ⁷	4,2X10 ⁷	2X10 ⁷	1,5X10 ⁷	1,5X10 ⁷
	coliformes		10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	7X10 ³	2X10 ³	6X10 ³
Bactéries lactiques	totales thermophiles mésophiles		1X10 ⁹ 8X10 ⁸ 3X10 ⁷	1X10 ⁹ 10 ⁹ 3X10 ⁷	2X10 ⁸ 8X10 ⁷ 2,4X10 ⁷	2X10 ⁸ 3X10 ⁸ 10 ⁷	1,5X10 ⁸ 6X10 ⁷ 10 ⁷	1,5X10 ⁸ 6X10 ⁷ 5X10 ⁹
	<i>Leuconostoc</i>	<i>dextranicum citrovorum</i>	5X10 ⁴ 4X10 ⁸	5X10 ⁴ 4X10 ⁸	4X10 ⁹ 10 ⁷	4X10 ⁹ 10 ⁷	4X10 ⁷ 4X10 ⁷	4X10 ⁷ 4X10 ⁷
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis durans</i>	10 ³ 10 ⁵	10 ³ 10 ⁵	10 ³ 10 ⁵	10 ⁴ 10 ⁴	10 ⁵ 10 ⁵	10 ⁵ 10 ⁵
	Levures		1,6X10 ⁹	1,6X10 ⁹	9X10 ⁹	5X10 ⁹	5X10 ⁹	9X10 ⁹
Eumicètes	<i>Penicillium</i>		prés.	prés.	prés.	prés.	prés.	prés.

L. buchneri et *Leuconostoc spp.* Ces derniers ayant été identifiés comme *Leuc. dextranicum* et *Leuc. citrovorum*, les deuxièmes en quantité plus forte. Il a été reconnu que les entérocoques appartaient en quantité égale aux espèces *faecalis* et *durans*. Dans l'ensemble, à part la microflore superficielle, on ne note pas de différences substantielles entre les contrôles et les formes sans croûte, ce qui signifie que l'absence de cette microflore n'influence pas d'une manière particulière celle qui se trouve au-dessous.

Le fromage SF à la fin de la maturation s'est présenté bien persillé par des *Penicillium roqueforti* var. *weidemannii*.

La microflore de la croûte est celle caractéristique du Gorgonzola [1] : levures (*Candida* et *Torulopsis*) et bactéries (*Micrococcus* et *Arthrobacter*).

TABLEAU 10

Nombre de micro-organismes/g de pâte.

Echantillons : sans « starters » (SF) et témoin correspondant (C)

Micro-organismes			Temps de prélèvement					
			Après salage		30 j		60 j	
			SF	C	SF	C	SF	C
Bactéries non lactiques	totales		3,5X10 ⁷	4,5X10 ⁷	6,6X10 ⁷	8X10 ⁶	1,2X10 ⁸	2X10 ⁸
	coliformes		3X10 ⁶	4X10 ⁵	3X10 ⁴	7X10 ⁵	4X10 ⁵	7X10 ⁵
Bactéries lactiques	totales thermophiles mésophiles		10 ⁹ 2X10 ⁷ 5X10 ⁸	3,2X10 ⁸ 10 ⁹ 8X10 ⁷	3X10 ⁸ 10 ⁷ 10 ⁸	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁷	2,5X10 ⁸ 8X10 ⁸ 10 ⁸	5X10 ⁷ 10 ⁷ 10 ⁷
	<i>Leuconostoc</i>	<i>dextranicum citrovorum</i>	2,4X10 ⁶ 1,5X10 ⁷	2,6X10 ⁶ 1,5X10 ⁷	8X10 ⁶ 1,2X10 ⁷	6X10 ⁶ 1,3X10 ⁷	8X10 ⁶ 4X10 ⁷	4X10 ⁶ 5X10 ⁷
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis durans</i>	10 ³ 10 ³	10 ⁵ 10 ³	10 ⁵ 10 ⁵	10 ⁶ 10 ⁵	10 ⁶ 10 ⁵	10 ⁶ 10 ⁶
	Levures		5X10 ⁵	3X10 ⁶	6X10 ⁶	8X10 ⁶	7X10 ⁷	7X10 ⁷
	<i>Penicillium</i>		prés.	prés.	prés.	prés.	prés.	prés.

Il est apparu que la microflore lactique était constituée principalement de formes mésophiles : *Str. lactis*, *L. casei*, *L. buchneri* et *Leuconostoc*, ces derniers étant identifiés comme *Leuc. citrovorum* et *Leuc. dextranicum*.

Les entérocoques sont subdivisés en deux espèces : *Str. faecalis* et *Str. durans*.

La différence entre les formes SF et celles de contrôle est due à la composition différente de la microflore lactique (en effet dans les formes SF elle est représentée principalement par des mésophiles, étant donné l'absence de « starters ») et au nombre plus élevé de coliformes, qui ressort d'ailleurs de l'ouverture plus abondante.

Le fromage SP s'est révélé exempt de *Penicillium* dans toutes les phases de la maturation, et particulièrement exempt de persillage à 60 j, à la différence du témoin.

TABLEAU 11

Nombre de micro-organismes/g de pâte au cours de la maturation.

Echantillons sans *Penicillium* (SP) et témoin correspondant (C)

Micro-organismes			Temps de prélèvement					
			Après salage		30 j		60 j	
			SP	C	SP	C	SP	C
Bactéries non lactiques	totales		30X10 ⁷	1,2X10 ⁷	2X10 ⁶	2X10 ⁶	3,2X10 ⁷	4,5X10 ⁷
	coliformes		3X10 ⁴	3X10 ⁴	10 ²	10 ²	10 ³	5X10 ⁴
Bactéries lactiques	totales		10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	2X10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
	thermophiles		6X10 ⁸	5X10 ⁸	8X10 ⁷	7X10 ⁷	10 ⁸	5X10 ⁵
	mésophiles		4,5X10 ⁷	4X10 ⁷	2,5X10 ⁷	3X10 ⁷	10 ⁸	5X10 ⁷
	<i>Leuco-nostoc</i>	<i>dextranicum</i>	6X10 ⁶	4X10 ⁶	5X10 ⁶	1,5X10 ⁷	7X10 ⁶	4X10 ⁶
		<i>citrovorum</i>	6X10 ⁷	2X10 ⁸	1,5X10 ⁸	6X10 ⁷	4X10 ⁷	4X10 ⁷
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
		<i>durans</i>	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵
Eumicètes	Levures		6X10 ⁵	2,2X10 ⁶	7X10 ⁵	8X10 ⁵	3,5X10 ⁶	2X10 ⁷
	<i>Penicillium</i>		abs.	abs.	abs.	abs.	abs.	abs.

La microflore de la croûte est celle caractéristique du Gorgonzola [1] ; levures (*Candida* et *Torulopsis*) et bactéries (*Micrococcaceae* et *Arthrobacter*). Il est apparu que la microflore lactique était constituée principalement de formes thermophiles du « starter » (*L. bulgaricus* et *Str. thermophilus*) et dans une mesure plus faible de mésophiles du lait (*Str. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri* et *Leuconostoc*, ces derniers ayant été identifiés comme *Leuc. dextranicum* et *Leuc. citrovorum*. Il a été reconnu que les entérocoques appartenait en quantité égale aux espèces *faecalis* et *durans*. La différence substantielle entre la forme SP et le contrôle est constituée par l'absence de *Penicillium*. Aucune autre différence particulière à signaler.

CONCLUSIONS

La microflore du Gorgonzola fabriqué suivant la technologie standard s'est révélée constituée par une riche association de bactéries lactiques et de *Penicillium*, ce qui confirme les indications contenues dans une précédente étude [1]. Les bactéries lactiques sont représentées : par les lactiques thermophiles des « starters » (*L. bulgaricus* et *Str. thermophilus*) présentes dès le début à des valeurs de plusieurs centaines de millions/g, puis qui diminuent lentement ; par les lactiques mésophiles qui se trouvent dans la cuve après la pasteurisation : celles-ci sont présentes au début en quantité toujours inférieure de plusieurs dizaines de millions à celle des thermophiles, bien qu'au cours de la maturation elles se maintiennent à des valeurs plus constantes, étant donné qu'aux températures d'affinage elles sont à même de survivre et, dans certains cas, de se multiplier. Elles se composent de : coques homofermentatifs (*Str. lactis*), lactobacilles homofermentants (*L. casei* et *L. plantarum*), coques hétérofermentants (*Leuc. citrovorum* et *Leuc. dextranicum*) et lactobacilles hétérofermentants (*L. brevis*, *L. buchneri*). La microflore eumicétique est représentée fondamentalement par le *Penicillium roqueforti* var. *weidemannii* et, en outre, par certaines levures de type *Torula*. Le *Penicillium* ajouté au lait sous forme de spores commence à sporuler et à devenir visible vers le 30^e jour, ce qui donne le caractéristique aspect persillé de la pâte.

La microflore de la croûte est représentée par des levures type *Torula* et des schizomycètes type *Micrococcus* et *Arthrobacter* qui confèrent la caractéristique couleur orangée.

D'intéressantes remarques sur l'importance réelle de chacun des groupements microbiens ont été mis en évidence par comparaison avec les formes à technologie modifiée. C'est ainsi que l'on a constaté que les formes sans croûte (SC) se distinguent du témoin (C) surtout par la plus forte acidité due à l'absence de l'action neutralisante de la microflore superficielle ; cette action, typique dans les fromages à maturation centripète, apparaît limitée dans le Gorgonzola aux couches superficielles et n'est pas en mesure d'influencer d'une manière considérable le biochimisme restant et les qualités organoleptiques. Le fromage obtenu sans les « starters » (SF) et laissé acidifier avec la microflore spontanée a permis un plus fort développement des coliformes, avec une ouverture évidente. Ceci provient de l'acidification inférieure dans les premières phases de la maturation ; la solubilisation de la caséine a été satisfaisante mais la dégradation est dans son ensemble inférieure au contrôle, comme le prouve le tracé électrophorétique et le dégagement inférieur d'amino-acides : même sous le profil organoleptique, cette forme s'est révélée inférieure au témoin. Ces données confirment

l'importance de la microflore des « starters » et des phénomènes d'interaction et complémentaires existant entre le *Penicillium* et les lactiques thermophiles [18]. Comme il ressort d'une précédente étude [1] l'influence du *Penicillium* est déterminante non seulement pour le persillage, mais aussi pour la structure de la pâte et pour le goût : la forme sans *Penicillium* a révélé des caractéristiques comparables à celles d'un fromage de type « Taleggio ». En présence de *Penicillium*, le tracé électrophorétique est caractéristique et suffit à rendre typique un fromage persillé par rapport à une maturation lactique : présence de fractions à basse vitesse électrophorétique dans la zone de la γ -caséine. L'action des moisissures apparaît encore déterminante vis-à-vis de l'activité lipolytique, comme le prouve la faible valeur de l'acide butyrique et des méthylcétones dans l'échantillon non persillé.

En conclusion, il ressort que tous les groupements microbiens exercent un rôle important dans le processus de maturation, fonctionnant comme des anneaux s'encastrant par suite d'évolutions biochimiques successives, et qu'il n'est pas facile de varier la technologie sans compromettre la réussite d'un produit désormais standardisé et répondant à la demande du consommateur.

Résumé

En vue d'améliorer les connaissances sur la chimie et la microbiologie du Gorgonzola, une étude a été effectuée sur des formes produites expérimentalement dans une fromagerie selon la technologie normale et parallèlement :

- 1) sans *Penicillium*,
- 2) sans « starters »,
- 3) sans microflore de la croûte.

Il est apparu que la microflore du Gorgonzola est constituée par une riche association microbienne, se composant surtout de bactéries lactiques et de *Penicillium*.

Les formes sans croûte diffèrent du contrôle par une plus grande acidité due à l'absence de l'action neutralisante de la microflore superficielle (*Micrococcus* et *Arthrobacter*).

Les formes sans « starters », qui permettent un plus fort développement de coliformes, ont en outre montré une dégradation des substances protéiques inférieure au contrôle, ce qui confirme l'importance des rapports d'interaction entre le *Penicillium* et les lactiques thermophiles inoculés. Enfin les formes sans *Penicillium* se sont révélées exemptes de persillé, plus acides et moins dégradées aussi bien du point de vue de la protéolyse que de la lipolyse.

Summary

In order to improve the knowledge of the chemistry and microbiology of Gorgonzola cheese, a research has been carried out on cheeses which were experimentally produced according to the normal technology and to parallel modified procedures : 1) without *penicillium*, 2) without starters, 3) without rind microflora.

The microflora of Gorgonzola has proved to consist of a rich microbial association, mainly represented by lactic acid bacteria and *Penicillium*.

The cheeses prepared without *Penicillium* proved to lack blue veining, to be more acid and to have undergone less proteolysis and lipolysis.

The cheeses produced without starters, besides allowing a stronger growth of coliform bacteria, showed weaker proteolysis than the control, which confirms the importance of the interaction between *Penicillium* and the thermophilic lactic acid bacteria.

The rindless cheeses differed from the control by a higher acidity due to the absence of the neutralizing effect of the rind microflora (*Micrococcus* and *Arthrobacter*).

Bibliographie

- [1] OTTOGALLI (G.), RESMINI (P.), BIANCHI (B.), GALLI (A.), RONDININI (G.), SALVADORI (P.), SARACCHI (S.), VOLONTERIO (G.) (1971). — Ricerche sulla maturazione del Gorgonzola sotto il profilo chimico e microbiologico. *Il Latte*, 45, 776.
- [2] DEL FORNO (G.) (1971). — Il formaggio Gorgonzola. *Tipolitografia Atena*, Roma.
- [3] SAVINI (E.) (1946). — Il Latte. *Hoepli*, Milano.
- [4] RESMINI (P.), VOLONTERIO (G.), SARACCHI (S.), ANNIBALDI (S.) (1971). — Esperienze di fabbricazione di formaggio Parmigiano-Reggiano con enzima coagulante « Suparen ». Nota 2. *Sci. Tecn. Lat. Cas.*, 22, 406.
- [5] RESMINI (P.), SARACCHI (S.), PERI (C.) (1972). — Frazionamento e concentrazione dei costituenti azotati nel corso della ultrafiltrazione del latte. *Atti SIPIA Congresso su « Applicazione dei processi per membrana nel settore lattiero caseario »*, Milano.
- [6] SCHWARTZ (D. P.), PARKS (O. W.) (1963). — Methyl Ketones in Roquefort cheese. *J. Dairy Sci.*, 46, 1422.
- [7] SCHWARTZ (D. P.), HALLER (H. S.), MARK KEENEY (1963). — Direct quantitative isolation of mono carbonyl compounds from fats and oils. *Anal. Chem.*, 35, 2131.
- [8] KALLIO (H.), LINKO (R.), KAITARANTA (J.) (1972). — Gas-liquid chromatographic analysis of 2,4-dinitrophenyl hydrazones of carbonyl compounds. *J. Chromatogr.*, 65, 355.

- [9] KADERAVEK (G.), VOLONTERIO (G.) (1966). — Ancora sull'analisi gas-cromatografica degli acidi grassi a catena corta. Nota 2. *Riv. It. Sost. Grasse*, 43, 9.
 - [10] TOKITA (F.), HOSONO (A.) (1968). — Studies on and behaviour of amines produced by *Brevibacterium linens*. *Milchw.*, 23 (11), 690.
 - [11] GASCO (L.), BARRERA (R.) (1972). — Use of derivates from gas-chrom. Identification of alcohols, primary and secondary amines and thiols in food aromas. *Anal. Chim. Acta*, 61, 253.
 - [12] OTTOGALLI (G.), GALLI (A.) (1967). — Ricerche sul fermenti lattici della specie *Streptococcus thermophilus*. Nota 4. Reperimento e determinazione quantitativa nel latte e derivati. *Ann. Micr.*, 17, 135.
 - [13] SHARPE (M. E.), FRYER (T. F.), SMITH (D. C.) (1966). — Identification of lactic acid bacteria da Gibbs B. M. and Skinner F. A. « Identification methods for microbiologists » part. *Academic Press* London and New-York, 65.
 - [14] MAJEUX (J. V.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) (1962). — A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, 655.
 - [15] GARVIE (E. I.) (1960). — The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27, 283.
 - [16] BARNES (E. M.) (1959). — Differential and selective media for the faecal streptococci. *J. Sci. Food. Agric.*, 12, 656.
 - [17] MOSSEL (D. A. A.), BECHET (J.), LAMBION (R.) (1962). — La prévention des infections et des toxi-infections alimentaires. *C.E.P.I.A.* Bruxelles, 190.
 - [18] BIANCHI (B.), SALVADORI (B.) (1973). — Impiego razionale degli innesti nella produzione dei formaggi molli. *Sci. Tecn. Lat. Cas.*, 24 (3), 161.
 - [19] RESMINI (P.), VOLONTERIO (G.), SARACCHI (S.), DIECI (E.) (1973). — Studi sulla maturazione del formaggio Parmigiano-Reggiano ottenuto con latte di vacche « Reggiane » e di vacche « Frisone ». *Sci. Tec. Lat. Cas.* in corso di stampa.
-