



**CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA FLORE MICROBIENNE
DU FROMAGE DE TYPE SAINT-PAULIN**

I. SON ÉVOLUTION AU COURS DE LA MATURATION

par

A. DUCASTELLE (1) et J. LENOIR

Laboratoire de Technologie

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon (S.-et-O.)

Introduction

Les microorganismes jouent un rôle essentiel au cours de la maturation des fromages et ce rôle a notamment été établi à la suite des travaux de Duclaux [4], de Freudenreich [5], de Orland-Jensen [13] et de Mazé [12]. Toutefois, l'importance numérique des divers groupes microbiens présents et, surtout, l'action respective de chacun de ces groupes ne sont encore bien souvent qu'imparfaitement connues. Ainsi, pour de nombreux types de pâtes fromagères, il est difficile de préciser si la maturation, et plus particulièrement la dégradation des matières azotées, est principalement due à l'activité des germes apportés par le levain ou si, au contraire, la flore spontanée joue un rôle majeur dans cette dégradation.

Jusqu'ici, de tels problèmes ont surtout été étudiés sur des fromages étrangers, notamment le Cheddar [14, 1, 2], et les travaux relatifs aux fromages fabriqués en France sont assez peu nombreux.

Récemment, l'un de nous a cherché à préciser, sur un fromage à pâte molle du type Camembert, la nature de la flore microbienne, notamment son évolution au cours de la maturation [8] et ses espèces dominantes [9]. Nous nous sommes proposés de réaliser une étude comparable sur un fromage à pâte pressée, le Saint-Paulin.

Protocole expérimental

A. — Prélèvement des échantillons

Notre étude a porté sur trois séries de fromages fabriqués dans une même usine (2) à partir de lait pasteurisé.

(1) Centre de troisième cycle de Science du Lait.

(2) Coopérative Laitière de Brion (M.-et-L.).

Une première série, comportant 6 échantillons ayant atteint des stades de maturation différents, a été prélevée le même jour (série S₁) ; les fromages de cette série correspondent donc à des fabrications différentes.

Les deux autres séries de fromages (séries S₂ et S₃) proviennent chacune d'une même fabrication et les échantillons ont été prélevés à différents stades de l'affinage.

Les fromages, au nombre de deux par prélèvement, ont été maintenus à basse température pendant le transport et analysés séparément le lendemain de la date du prélèvement.

B. — Méthodes d'analyse

L'analyse microbiologique des échantillons a comporté les opérations suivantes :

Après le découpage du fromage en trois secteurs et homogénéisation au mortier des portions prélevées, 10 grammes de pâte, pesés au décigramme près, sont dissous dans 90 ml de solution stérile de citrate de soude à 2 p. 100, préalablement chauffés à 45° C [6].

Des dilutions convenables dans une solution de Ringer au 1/4 sont effectuées et les groupes microbiens suivants sont dénombrés par ensemencement en boîtes de Pétri :

- La microflore totale sur gélose nutritive (1) ;
- Les streptocoques sur gélose nutritive additionnée de 0,5 p. 1 000 d'acétate de thallium [7].
- Les lactobacilles sur milieu de Rogosa modifié par Mabbitt et Zielinska [10].
- Les levures sur malt gélosé pH 4,5.
- Les microcoques et autres bactéries halophiles sur milieu de Chapman [3].

En outre, certains caractères de la pâte, susceptibles d'influer sur le développement et l'activité des microorganismes, ont été déterminés : la teneur en matière sèche par la méthode au sable à 102-105° C, la teneur en sel par la méthode A.O.A.C., le pH par potentiométrie sur une suspension de fromage à 10 p. 100 dans l'eau bidistillée.

Enfin un examen chimique et microbiologique de la saumure utilisée lors de la fabrication des fromages de la série S₁ a été effectué.

Résultats

Les résultats concernant les caractéristiques chimiques des échantillons sont groupés dans le tableau 1. La teneur en matière

(1) Formule du milieu : Extrait de viande (Difco) : 5 g ; extrait de levure (Difco) : 3 g ; bacto tryptone (Difco) : 10 g ; glucose : 5 g ; gélose : 15 g ; eau distillée q.s.p. 1 000 ml ; pH final : 7,1-7,2.

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES DES ÉCHANTILLONS

Jours de maturation		1 caillé non salé	2 caillé salé	5-7	10-11	14	17-20	25
Matière sèche (g %)	S ₁	46,3	46,3	46,7	47,3	48,7	49,1	—
	S ₂ (2)	46,0	46,8	46,3	46,3	46,0	47,0	48,0
ClNa (g %)	S ₁	0,1	I (1) 1,2 E (1) 2,0	—	I 1,6 E 2,1	1,90	I 1,6 E 1,6	—
	S ₂ (2)	0,05	2,0	1,87	1,84	2,0	2,4	2,15
pH	S ₁	5,46	5,42	5,68	5,68	5,72	5,75	—
	S ₂ (2)	5,50	5,42	5,57	5,63	5,79	5,77	5,70
	S ₃ (2)	5,40	—	5,50	5,70	—	5,70	—

(1) I : Intérieur du fromage. — E : Partie superficielle.

(2) Les caractéristiques des échantillons des séries S₂ et S₃ sont empruntées à une étude complémentaire réalisée par M. Galzin.

sèche, comprise entre 46 et 49 p. 100, augmente légèrement au cours de la maturation. La teneur en sel, voisine de 2 p. 100, varie peu d'un échantillon à l'autre. Comme il est normal, on note sur les fromages jeunes une différence dans les teneurs en chlorure de sodium de la partie superficielle, couche externe de 1 cm d'épaisseur, et du cœur du fromage. Cette différence, sensible dans le caillé, est déjà très atténuée après dix jours et disparaît en fin de maturation. L'évolution du pH est comparable d'une série à l'autre. Cette évolution se caractérise par sa faible amplitude. Après une très faible acidification dans les premiers jours de fabrication, on constate une lente et légère remontée du pH qui, en fin de maturation, atteint 5,7-5,8.

Le tableau II groupe les résultats des dénombrements effectués. Bien que d'une série à l'autre ces résultats ne soient pas toujours parfaitement concordants on relève cependant une certaine similitude dans les nombres de germes à un stade donné de la maturation et, par suite, dans l'évolution des diverses populations. La figure 1 concrétise cette évolution.

TABLEAU II

LA MICROFLORE DU SAINT-PAULIN AUX DIVERS STADES DE LA MATURATION
(Nombre de germes par gramme de fromage)

Jours de maturation		1 (caillé non salé)	2 (caillé salé)	5-7	10-11	14	17-20	25
Germes totaux	S ₁	1,9 . 10 ⁹	—	5 . 10 ⁸	3 . 10 ⁸	2,4 . 10 ⁸	2,4 . 10 ⁸	—
	S ₂	1,3 . 10 ⁹	1,2 . 10 ⁹	—	2,5 . 10 ⁸	2 . 10 ⁸	2,6 . 10 ⁸	0,6 . 10 ⁸
	S ₃	1,8 . 10 ⁹	—	7,2 . 10 ⁸	2 . 10 ⁸	—	1 . 10 ⁸	—
Streptocoques	S ₁	4,2 . 10 ⁸	—	4,2 . 10 ⁸	—	—	—	—
	S ₂	4,8 . 10 ⁸	4,1 . 10 ⁸	2,6 . 10 ⁸	1,3 . 10 ⁸	1,3 . 10 ⁸	1,2 . 10 ⁸	0,6 . 10 ⁸
	S ₃	5,3 . 10 ⁸	—	4 . 10 ⁸	1 . 10 ⁸	—	0,9 . 10 ⁸	—
Lactobacilles	S ₁	4 . 10 ³	6 . 10 ³	7 . 10 ³	9 . 10 ⁴	3 . 10 ⁵	6 . 10 ⁵	—
	S ₂	60	3 . 10 ²	8 . 10 ²	1 . 10 ³	3 . 10 ³	5 . 10 ³	6 . 10 ³
	S ₃	10	—	1 . 10 ²	8 . 10 ²	—	3 . 10 ³	—
Microcoques et bactéries halophiles	S ₁	5 . 10 ⁴	2 . 10 ⁵	1,5 . 10 ⁵	1,5 . 10 ⁵	2,6 . 10 ⁶	2 . 10 ⁷	—
	S ₂	5 . 10 ⁴	3 . 10 ⁵	4 . 10 ⁵	6 . 10 ⁵	8 . 10 ⁵	7 . 10 ⁶	2 . 10 ⁶
	S ₃	1 . 10 ⁴	—	0,9 . 10 ⁵	3 . 10 ⁵	—	5 . 10 ⁶	—
Levures	S ₁	5 . 10 ⁵	1 . 10 ⁵	2 . 10 ⁵	1 . 10 ⁵	1 . 10 ⁵	1 . 10 ⁵	—
	S ₂	3 . 10 ³	3 . 10 ³	5 . 10 ³	7 . 10 ³	2 . 10 ⁴	4 . 10 ⁴	5 . 10 ⁴
	S ₃	1 . 10 ³	—	1 . 10 ³	3 . 10 ³	—	7 . 10 ³	—

Discussion des résultats

La microflore totale représente dans le caillé, au stade 1 et 2 jours, un nombre de germes voisin de 10⁹ par gramme. Par son importance cette population est donc comparable à celle observée dans d'autres types de fromages jeunes, tels le Cheddar [6], le Camembert [8]. Après quelques jours de maturation on constate une diminution très sensible du nombre de germes vivants ; au dixième jour celui-ci est de l'ordre de 10⁸ par gramme. Par la suite, la population microbienne reste proche de cette valeur. On doit donc admettre que, dans les premiers jours de la maturation, une proportion très importante des microorganismes présents initialement dans le caillé meurt. Ces germes pourront alors, après lyse de la cellule microbienne, intervenir dans le phénomène de l'affinage par leurs enzymes intracellulaires libérées.

Les streptocoques constituent l'essentiel de la flore microbienne des échantillons. Ces germes proviennent du levain ajouté au lait

pasteurisé mis en fabrication. Leur nombre tend, lui aussi, à diminuer au cours de l'affinage et, après une dizaine de jours, on ne trouve que le $1/5^e$ de la population lactique dénombrée sur le caillé. Notons cependant une anomalie dans les résultats obtenus sur les fromages âgés de 1 et 2 jours. Le nombre de streptocoques y apparaît en effet singulièrement faible par rapport à la population microbienne totale. Il est cependant très improbable que des germes appartenant à des groupes autres que ceux dénombrés constituent la flore dominante des caillés. Il est plus vraisemblable que la disparité constatée s'explique par une action inhibitrice du milieu à l'acétate de thallium, action qui serait plus particulièrement marquée sur les bactéries du levain au moment de leur implantation dans le caillé. Cette hypothèse a été vérifiée par ensemencement d'un levain lactique et d'un caillé frais sur une gélose nutritive et sur le milieu à l'acétate de thallium. Sur ce dernier on observe

LOG. N

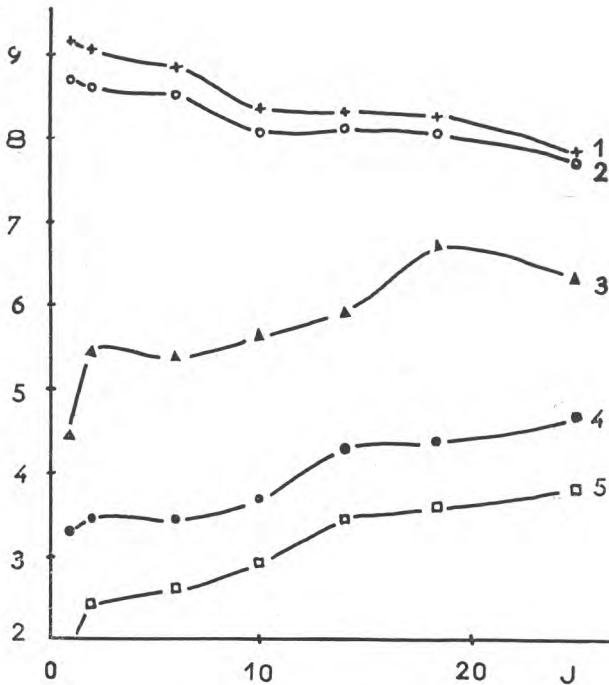


Fig. 1. — Evolution de la flore microbienne du Saint-Paulin au cours de la maturation.

1. germes totaux ; 2. streptocoques ; 3. micrococques ; 4. levures ; 5. lactobacilles.

En abscisses : logarithme du nombre de germes (moyenne des séries S_2 et S_3)
En ordonnée : temps de maturation, en jours.

un nombre de colonies très inférieur au nombre de germes totaux. Or l'isolement de 60 colonies développées sur chacun des deux milieux a permis de caractériser, dans l'un et l'autre cas, 60 streptocoques. Le nombre réel de streptocoques est donc certainement plus élevé que celui qui est constaté par dénombrement sur milieu à l'acétate de thallium et il est vraisemblable que, dans les caillés, la flore streptococcique est très largement dominante.

Les lactobacilles ne sont présents qu'en nombre extrêmement faible et pratiquement insignifiant dans les caillés et dans les fromages jeunes. On constate qu'ils tendent à se multiplier dans la pâte en voie de maturation, mais leur nombre, qui finalement atteint quelques milliers de germes par gramme, reste peu important si on le compare à la population microbienne totale.

Les microcoques et autres bactéries halophiles ne représentent également dans les caillés frais qu'une population numériquement très réduite, quelques dizaines de milliers de germes par gramme. Toutefois, on observe une augmentation sensible du nombre de microcoques à la suite du salage ; après séjour en saumure, le caillé en renferme plusieurs centaines de milliers par gramme. L'immersion du caillé dans le bain de saumure correspond donc à un ensemencement de la pâte fromagère en microorganismes halophiles. Cette hypothèse se trouve confirmée par les résultats des examens microbiologiques effectués sur la saumure utilisée. La population microbienne de cette dernière est d'environ 100 000 germes par millilitre et elle apparaît essentiellement formée de microcoques. On remarque aussi que le peuplement en microcoques croît au cours de l'affinage des fromages, notamment à partir du dixième jour. Après 15 à 20 jours de maturation il atteint plusieurs millions de germes par gramme de pâte.

Le peuplement en levures reste faible du début à la fin de l'affinage. Sur les fromages des séries S_2 et S_3 , on observe un développement de cette population mais il n'en est pas de même sur ceux de la série S_1 . On note en outre que les fromages de la série S_1 présentent un nombre de levures relativement important et sensiblement plus élevé que celui observé sur les fromages des deux autres séries. Une différence analogue est d'ailleurs constatée sur le peuplement en lactobacilles.

Conclusion

De ces diverses observations il résulte que la microflore des fromages de Saint-Paulin étudiés est formée essentiellement par les bactéries du levain, c'est-à-dire les streptocoques. Les autres groupes microbiens, et notamment les levures et les lactobacilles, ne représentent qu'une fraction très faible de la population totale, aussi bien dans les caillés que dans les fromages mûrs. Au regard des phénomènes de maturation, et notamment de la dégradation

des matières azotées, ces deux groupes ne peuvent probablement jouer qu'un rôle mineur. Il n'en est sans doute pas de même en ce qui concerne les microcoques. Certes, ceux-ci sont très peu nombreux dans les caillés non salés, mais le passage en saumure s'accompagne d'un apport substantiel en germes de ce groupe. En outre, les microcoques se multiplient au cours de l'affinage et en fin de maturation leur nombre représente une proportion appréciable de la microflore totale. Par ailleurs, l'on sait que plusieurs espèces microbiennes du genre *Micrococcus* sont des agents protéolytiques actifs.

Les échantillons étudiés provenant d'une même usine, on ne peut affirmer que les résultats obtenus caractérisent réellement le type de fromage. Cependant des observations antérieures, effectuées sur des fromages de Saint-Paulin affinés de diverses origines, ont mis en évidence des populations microbiennes comparables par leur importance numérique globale et par leur répartition en groupe [11]. Il semble donc permis de considérer les résultats de la présente étude comme représentatifs de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin.

Remerciements

Nous remercions M. Rougier, directeur de la Coopérative Laitière de Brion, d'avoir bien voulu mettre à notre disposition les échantillons nécessaires à la réalisation de ce travail.

Résumé

L'importance relative de quelques groupes microbiens, streptocoques, lactobacilles, microcoques et levures, et l'évolution de ces groupes au cours de la maturation ont été étudiées sur trois séries de fromages de type Saint-Paulin fabriqués dans une même usine à partir de lait pasteurisé.

Les streptocoques, essentiellement originaires du levain, apparaissent largement dominants à tous les stades de l'affinage mais leur nombre diminue sensiblement au cours de la maturation. Les lactobacilles et les levures ne représentent, surtout dans les caillés, qu'une fraction très faible de la microflore totale. Les microcoques se trouvent introduits dans la pâte en nombre substantiel lors du salage en saumure ; par la suite, au cours de la maturation, ces germes se développent assez activement.

Summary

The relative importance of some microbial groups, streptococci, lactobacilli, micrococci and yeasts, and their evolution during the ripening have been studied on three series of cheeses type Saint-Paulin made in the same plant with pasteurized milk.

Streptococci, coming mainly from starter, appear widely predominant at every stadia of the ripening but their number slightly decreases during the maturing. Lactobacilli and yeasts represent but a very little part of the whole microflora, chiefly in the curd. Micrococci are substantially put into the paste at the time of the brine salting. After that, those germs develop themselves rather briskly, during the maturation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. A. ALFORD et W. C. FRAZIER. — Effect of micrococci on the development of flavor when added to Cheddar cheese made from pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 1950, 33, 115-120.
- [2] L. E. BARIBO et E. M. FOSTER. — The intracellular proteinases of certain organisms from cheese and their relationship to the proteinases in cheese. *J. Dairy Sci.*, 1952, 35, 149-160.
- [3] G. H. CHAPMAN — The significance of sodium chloride on studies of staphylococci. *J. Bact.*, 1945, 50, 201.
- [4] E. DUCLAUX. — Principes de laiterie, Paris, 1883.
- [5] E. DE FREUDENREICH. — *Revue Gén. du Lait*, 1901-1902.
- [6] B. W. HAMMER et F. J. BABEL. — Dairy Bacteriology 4^e édition, Wiley and Sons, New-York, 1957.
- [7] A. HIRSCH, M. McCLINTOCK et G. MOCQUOT. — Observations on the influence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyère cheese on the development of anaerobic sporeformers. *J. Dairy Res.*, 1952, 19, 179-186.
- [8] J. LENOIR. — La flore microbienne du Camembert et son évolution au cours de la maturation. *C. R. Ac. Agr.*, 1962, 48, 392-399.
- [9] J. LENOIR. — Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Camembert. A paraître in C.R. XVII^e Congrès International de Laiterie, 1966.
- [10] L. A. MABBITT et M. ZIELINSKA. — Selective medium for numeration of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 1956, 19, 95.
- [11] J. F. MARCERON, J. LENOIR et R. VEISSEYRE. — Contribution à l'étude de l'activité protéolytique de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. A paraître in C.R. XVII^e Congrès International de Laiterie, 1966.
- [12] P. MAZE. — Technique fromagère. *Ann. Inst. Pasteur*, 1910.
- [13] S. ORLA-JENSEN. — *Rev. Gén. du Lait*, 1905-1906.
- [14] M. H. PETERSON, M. J. JOHNSON et W. V. PRICE. — Protéinases content of Cheddar cheese during making and ripening. *J. Dairy Sci.*, 1948, 31, 55-61.