

La flore microbienne du fromage de Roquefort

V. - Les lactobacilles

par

J. J. DEVOYOD

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

avec la collaboration de Marie-Josèphe LAPIERRE

INTRODUCTION

Si les lactobacilles ont été étudiés dans la fabrication et la maturation des fromages à pâte cuite (Gruyère, Emmental) et des fromages à pâte pressée (Cheddar, Edam), il n'en est pas de même pour les fromages bleus. Les seuls travaux relatifs à ces micro-organismes sont ceux de Sharpe et Brindley (1956) qui ont isolés et identifiés les lactobacilles de la surface du fromage de Stilton. Ces auteurs ont montré que *Lactobacillus plantarum* était l'espèce la plus fréquemment rencontrée. Bogdanov et Iefimchenko (1939) ont analysé la flore lactique de trois fromages de type Roquefort et ils ont constaté que le nombre de *L. casei* atteignait 600 millions par g de fromage après 10 jours de fabrication, que ce nombre restait à peu près constant pendant un mois et diminuait ensuite.

Il nous a paru intéressant, dans le cadre de notre étude sur la flore microbienne du fromage de Roquefort, de suivre, au cours de la fabrication et de l'affinage, l'évolution des lactobacilles et de rechercher à quelles espèces ils appartenaient.

MATERIELS ET METHODES

Fabrication et affinage

Nous avons suivi deux fabrications traditionnelles de fromage de Roquefort. L'emprésurage du lait, le travail du caillé, la mise en moules, le salage et l'affinage étaient réalisés selon les méthodes traditionnelles en usage à Roquefort, méthodes décrites par Mocquot et Bejambes (1960).

Echantillons

Un échantillon de lait était prélevé juste avant l'emprésurage. Des échantillons de fromage étaient prélevés aux différents stades de la fabrication et de l'affinage. On prélevait chaque fois sur un fromage différent, provenant d'une même fabrication, trois échantillons : deux échantillons de la surface du fromage, par grattage de chacune des faces, et un échantillon au centre du fromage, à l'aide d'une sonde.

Examen bactériologique du lait et du fromage

Le dénombrement des lactobacilles a été effectué en utilisant le milieu de Rogosa et *al.* (1951) et le milieu M.R.S. (de Man et *al.*, 1960). Les milieuxensemencés étaient incubés à 37° C dans des tubes de 8 × 400 mm (Raibaud et *al.*, 1966). En plus des lactobacilles, nous avons dénombré les germes totaux, les bactéries coliformes, les levures et les staphylocoques et les microcoques. Les techniques et milieux utilisés pour ces dénombrements ont été décrits précédemment (Devoyod et *al.*, 1968).

Isolement et identification

Pour chaque échantillon de lait et de fromage, 5 à 10 colonies isolées sur milieu de Rogosa ou milieu M.R.S. étaient repiquées sur bouillon M.R.S. Après purification, les souches étaient conservées à -30° C (1 ml de culture de 16 h pour 9 ml de lait tournesolé).

L'identification des souches de lactobacilles a été faite selon les critères définis par Sharpe (1962 a).

Les caractères suivants d'identification ont été étudiés :

1) *Morphologie*

Un examen microscopique était effectué, après coloration de Gram, sur une culture de 16 h à 37° C sur bouillon M.R.S.

2) *Production de catalase*

Une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes était déposée sur une colonie développée pendant 48 h sur milieu M.R.S., afin d'observer la formation éventuelle de bulles d'oxygène.

3) *Croissance à différentes températures*

Le bouillon M.R.S. était amené préalablement à la température voulue : 15° C ($\pm 0,5^\circ$ C), 45° C et 48° C ($\pm 0,1^\circ$ C) puisensemencé. Le développement des souches était apprécié après 3 jours et 1 semaine pour les cultures à 15° C, 24 et 48 h pour les cultures à 45° C et à 48° C, par comparaison avec un tube de milieu nonensemencé incubé à la même température (appréciation de la turbidité et mesure du pH).

4) *Production de CO₂ à partir du glucose*

Le milieu M.R.S., gélosé à 0,5 p. 100, et contenant 5 p. 100 de glucose a été utilisé. Le milieu étaitensemencé et transvasé dans des tubes Veillon ; après refroidissement, un bouchon de gélose double était coulé dans les tubes. Les cultures étaient incubées à 30° C et 37° C et examinées chaque jour pendant 2 semaines.

5) *Résistance à un chauffage de 63° C pendant 30 mn*

La méthode décrite par Abd-el-Malek et Gibson (1948) a été utilisée.

6) *Désamination de l'arginine*

Le milieu de Niven et al. (1942) a été utilisé. Après 48 h et 1 semaine d'incubation, la présence d'ammoniaque dans les cultures était décelée en ajoutant, sur une plaque à touches, une goutte de réactif de Nessler à une goutte de culture. La lecture des résultats se faisait immédiatement après addition du réactif.

7) *Résistance au chlorure de sodium*

Les souches étaient cultivées pendant 72 h dans le milieu M.R.S. contenant 2 - 4 - 6,5 et 7,5 p. 100 de ClNa (concentration finale). Le développement des cultures était apprécié par comparaison avec un tube témoin nonensemencé, incubé à la même température (examen de la turbidité et mesure du pH).

8) *Résistance au teepol*

Le bouillon M.R.S. était additionné de teepol à différentes concentrations (0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 et 0,7 g p. 100 ml). Les cultures étaient incubées pendant 2 semaines. On appréciait le développement des cultures par comparaison avec un tube témoin, nonensemencé, incubé à la même température (examen de la turbidité et mesure du pH).

9) *Acidité titrable*

Les souches étaientensemencées à 1 p. 100 dans des tubes contenant 15 ml de lait autoclavé. Après 2 semaines d'incubation, l'acidité produite était titrée sur 10 g de culture à l'aide de soude N/9, en présence de phénolphthaléine.

10) *Production d'acide à partir des glucides et alcools*

Le milieu de base utilisé était le bouillon M.R.S. exempt de glucose et d'extrait de viande. La concentration finale en glucides et alcools était de 0,5 g p. 100 ml de milieu. Les glucides et alcools suivants ont été essayés : amygdaline, arabinose, cellobiose, dextrine, glucose, glycérol, inositol, lactose, maltose, mannitol, mélezitose, mélibiose, raffinose, rhamnose, saccharose, salicine, sorbose et tréhalose.

11) *Caséolyse*

Les souches étaient cultivées d'une part sur gélose nutritive Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de lait écrémé stérile (concentration finale 10 p. 100 et d'autre part sur gélose au caséinate de sodium (Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco n° 27). Les colonies qui présentaient une auréole claire après addition de chlorure mercurique acide (Frazier, 1926) étaient considérées comme caséolytiques.

12) *Configuration de l'acide lactique*

La méthode d'Orla-Jensen (1904) a été utilisée. Les souches étaient cultivées sur bouillon M.R.S. Après une incubation d'une semaine, l'acide lactique était extrait sous forme de lactate de zinc. Le pouvoir rotatoire et la teneur en eau de cristallisation du lactate de zinc formé étaient déterminés.

13) *Hydrolyse de l'esculine*

Le milieu utilisé était celui décrit par Gemmel et Hodgkiss (1964). L'hydrolyse de l'esculine était appréciée par perte de la fluorescence en lumière ultra-violette et formation de cristaux d'esculetine.

RESULTATS

Evolution des lactobacilles au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort

Le résultat du dénombrement des lactobacilles et des germes totaux à la surface et au centre du fromage de Roquefort au cours des différents stades de la fabrication et de l'affinage est donné dans le tableau 1.

Pour les échantillons prélevés à la surface du fromage, nous constatons une augmentation continue du nombre des lactobacilles jusqu'avant le salage. Le rapport lactobacilles/germes totaux ($\times 100$) varie peu au cours du salage ; ceci est dû au fait que le nombre des lactobacilles et des germes totaux (essentiellement des streptocoques lactiques) diminue dans les mêmes proportions. Au cours de l'affinage le nombre des lactobacilles varie peu.

Au centre du fromage, nous constatons que le nombre des lactobacilles augmente jusqu'au salage. Au cours du salage, le nombre des lactobacilles diminue mais moins que celui des germes totaux. Jusqu'à la mise des fromages sous feuilles d'étain, les lactobacilles représente $1/8$ à $1/3$ de la flore totale. Au cours de l'affinage leur nombre diminue plus rapidement que celui des germes totaux et le rapport lactobacilles/germes totaux ($\times 100$) diminue de 30 à 5 environ.

TABLEAU 1

Lactobacilles et germes totaux aux différents stades de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort
(Les résultats sont donnés en millions de germes par g de fromage)

	Stade de la fabrication	Surface du fromage			Centre du fromage		
		Lacto- bacilles	Germes totaux	Lactobacilles	Lacto- bacilles	Germes totaux	Lactobacilles
				× 100			× 100
				Germes totaux			Germes totaux
Fabrication 1	24 h après emprésurage	8	5 700	0,1	6	5 600	0,1
	48 h après emprésurage	24	3 900	0,6	14	3 500	0,4
	Fromages en salle froide	70	8 100	0,9	96	3 500	2,7
	Avant salage	370	3 600	10,2	450	3 400	13,2
	Après salage	30	260	11,5	240	690	34,9
	25 j après emprésurage	35	750	4,6	180	595	30,4
	35 j après emprésurage	27	1 350	2,0	140	800	17,5
	70 j après emprésurage	19	915	2,0	50	660	7,5
	100 j après emprésurage	12	1 100	1,1	20	320	6,2
Fabrication 2	24 h après emprésurage	10	7 000	0,1	15	7 100	0,2
	48 h après emprésurage	23	3 500	0,6	38	3 700	1,0
	Avant salage	420	3 700	11,5	320	3 300	9,7
	Après salage	7	58	12,1	60	180	33,3
	25 j après emprésurage	31	900	3,4	226	800	28,4
	35 j après emprésurage	40	1 600	2,5	122	1 000	12,2
	70 j après emprésurage	20	900	2,2	236	3 700	6,4
	100 j après emprésurage	11	620	1,8	26	500	5,2

Le dénombrement des bactéries coliformes, des levures et des microcoques a donné des résultats comparables à ceux obtenus antérieurement (Devoyod et *al.*, 1966 et 1968) montrant ainsi que l'évolution de la flore microbienne des fromages dont nous avons suivi la fabrication et l'affinage était semblable à celle rencontrée dans d'autres fabrications traditionnelles.

Caractères biochimiques des souches isolées

Soixante-six souches de lactobacilles ont été isolées du lait de brebis et du fromage de Roquefort aux différents stades de la fabrication et de l'affinage ; 30 appartenaient à l'espèce *L. casei* et 36 à l'espèce *L. plantarum*. Les souches de *L. casei* ont été isolées des échantillons prélevés à la surface du fromage avant salage et au centre jusqu'à la mise des fromages sous feuilles d'étain, elles ne se développaient pas en présence de 10 p. 100 de chlorure de sodium. Les souches de *L. plantarum* ont été principalement isolées à la surface et au centre du fromage après salage et au cours de l'affinage.

DISCUSSION

Evolution des lactobacilles au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort

1) A la surface du fromage

Nous avons vu que la majeure partie des souches de lactobacilles isolées à partir des échantillons prélevés au cours des premiers stades de la fabrication appartenait à l'espèce *L. casei* et ne se développait pas dans un milieu contenant 10 p. 100 de chlorure de sodium. Par contre les souches que nous avons isolées en surface après le salage (*L. plantarum*), étaient capables de se développer en présence de cette même concentration de ClNa. Le salage des fromages provoque donc à la fois une légère diminution du nombre des lactobacilles et aussi une sélection parmi ces lactobacilles. Après salage, nous avons constaté que le nombre des germes totaux augmentait alors que celui des lactobacilles variait peu. Cela peut s'expliquer par le fait qu'après le salage, la flore totale à la surface du fromage est constituée principalement de levures et de microcoques (Devoyod et *al.*, 1968) plus résistants au sel que les lactobacilles.

2) Au centre du fromage

Comme Bogdanov et Iefimchenko (1939), nous avons constaté que le nombre des lactobacilles était maximum après 10 jours de fabrication juste avant salage. Il est intéressant de noter que l'on rencontre un nombre maximum de lactobacilles après 10 jours de fabrication pour d'autres types de fromages fabriqués à partir de lait de brebis (Glukhov, 1965).

La diminution du nombre des lactobacilles au cours du salage est moins importante qu'à la surface parce que, lors du salage des fromages, la concentration en chlorure de sodium augmente progressivement au centre et non pas brutalement comme à la surface.

Caractères biochimiques des lactobacilles isolés du fromage de Roquefort

Les lactobacilles que nous avons isolés du fromage de Roquefort, *L. casei* et *L. plantarum*, appartiennent à des espèces très répandues dans les produits laitiers. Sharpe (1962 b) a étudié la distribution des lactobacilles dans différents laits de vache et dans les fromages fabriqués à partir de ces laits ; elle a constaté que *L. casei* se trouvait dans la plupart des échantillons de fromage et que *L. plantarum* était moins fréquent que *L. casei*. Par contre Kirov et Chomakov (1964) ont montré qu'au cours de l'affinage, la flore microbienne du fromage blanc de brebis conservé en saumure était constituée essentiellement de *L. plantarum* et ceci indépendamment de la composition du levain utilisé (*S. lactis* et *L. casei*).

Nos résultats ont montré qu'au cours de l'affinage, les lactobacilles représentaient une part non négligeable (de 5 à 10 p. 100) de la flore microbienne. Ces micro-organismes jouent-ils un rôle dans le fromage de Roquefort et dans les fromages bleus ? Seules des expérimentations en faisant entrer des lactobacilles dans la composition des levains nous permettront de répondre à cette question.

Résumé

L'évolution des lactobacilles au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort a été étudiée. Le nombre des lactobacilles est maximum juste avant le salage (300 à 400 millions/g de fromage). Soixante-six souches de lactobacilles ont été isolées et identifiées, 30 appartenaient à l'espèce *Lactobacillus casei* et 36 à l'espèce *L. plantarum*.

Summary

The microbial flora of Roquefort cheese
V - *The lactobacilli*

The development of lactobacilli was studied during the making and the ripening of Roquefort cheese. These organism are the more numerous just before salting (300 to 400 millions/g of cheese). 66 strains of lactobacilli were isolated and identified ; 30 belonged to the species *Lactobacillus casei* and 36 to the species *L. plantarum*.

Reçu pour publication en mars 1970.

Références bibliographiques

- [1] ABD-el-MALEK (Y.) et GIBSON (T.) (1948). — Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.*, 15, p. 233.
- [2] BOGDANOV (V. M.) et IEFIMCHENKO (A. I.) (1939). — Microflora changes in ripening Roquefort cheese. *Mikrobiologia*, 8, p. 251 (cité dans *Dairy Sci. Abstr.* (1948-49), 10, 58^e).
- [3] DEVOYOD (J. J.) et BRET (G.) (1966). — Evolution de la flore microbienne au cours de la fabrication de l'affinage du fromage de Roquefort. *XVII^e Cong. Int. Lait.*, D-2, p. 585.
- [4] DEVOYOD (J. J.) BRET (G.) et AUCLAIR (J. E.) (1968). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage. *Le Lait*, 479-80, p. 613.
- [5] FRAZIER (W. C.) (1926). — A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. inf. Dis.*, 39, p. 302.
- [6] GEMMEL (M.) et HODGKISS (W.) (1964). — The physiological characters and flagellar arrangement of motile homofermentative lactobacilli. *J. gen. Microbiol.*, 35, p. 519.
- [7] GLUKHOV (G.) (1965). — Développement de la flore microbienne dans les fromages de brebis. *Mol. Prom.*, 26, p. 17.
- [8] KIROV (N.) et CHOMAKOV (K.) (1964). — Microflora of ripe pickled cheese. *Khranit. Prom.*, 13, p. 23 (cité dans *Dairy Sci. Abstr.* (1965), 27, 1820).
- [9] DE MAN (J. C.), ROGOSA (M.) et SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. appl. Bact.*, 23, p. 310.
- [10] MOCQUOT (G.) et BEJAMBES (M.) (1960). — Technology of ewe's and goat's milk products. I. Ewe's milk products. *Dairy Sci. Abstr.*, 22, p. 1.
- [11] NIVEN (C. F.) Jr, SMILLEY (K. L.) et SHERMANN (J. M.) (1942). — The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bact.*, 43, p. 651.
- [12] ORLA-JENSEN (S.) (1904). — Studien über die flüchtigen Fettsäuren in Käse nebst Beiträgen zur Biologie des Käsefermente. *Centralbl. Bakt.*, II Abt., 13, p. 428 (communiqué par J. C. DE MAN).
- [13] RAIBAUD (P.), DICKINSON (A. B.), CHARLIER (H.) et MOCQUOT (G.) (1966). — La microflore du tube digestif du rat. I. Techniques d'études et milieux proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, 110, p. 568.
- [14] ROGOSA (M.), MITCHELL (J. A.) et WISEMAN (R. F.) (1951). — A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bact.*, 62, p. 132.
- [15] SHARPE (E.) (1962 a). — Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Sci. Abstr.*, 24, p. 109.
- [16] SHARPE (E.) (1962 b). — Enumeration and studies of lactobacilli in food products. *Dairy Sci. Abstr.*, 24, p. 165.
- [17] SHARPE (E.) et BRINDLEY (M.) (1956). — Lactobacilli isolated from the surface of normal and slipcoat Stilton cheese. *J. Dairy Res.*, 23, p. 361.

Remerciements

Nous remercions M. AUCLAIR pour ses suggestions et ses critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans la présentation de ce travail.