

Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort

II. Action de *Penicillium roqueforti* sur l'évolution de la flore microbienne

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 et Dominique SPONEM)

INTRODUCTION

Les propriétés protéolytiques et lipolytiques de *Penicillium roqueforti* ainsi que le rôle important que joue cette moisissure dans l'affinage des fromages bleus ont fait l'objet de nombreux travaux dont Bakalor (1962) a fait la synthèse. Par contre, quelques études seulement ont été consacrées aux interactions entre *P. roqueforti* et le reste de la flore microbienne. Par exemple, Clark et Golding (1949) ont mis en évidence une action stimulante des streptocoques lactiques vis-à-vis de la croissance de *P. roqueforti*, cette stimulation étant variable avec les souches de streptocoques utilisées. De leur côté, Proks et al. (1959) ont montré que les levures appartenant au genre *Torulopsis* avaient une action favorable sur la production par *P. roqueforti* des méthyl-cétones (composés importants de l'arôme du fromage de Roquefort). Nous avons constaté nous-mêmes que les micro-organismes responsables de l'ouverture du caillé, essentiellement les *Leuconostoc* et les levures fermentant le lactose (*Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis* et *Torulopsis sphaerica*) avaient une action bénéfique sur le développement du *Penicillium* (Devoyod et Muller, 1969 ; Devoyod et Sponem, 1970).

Les seuls renseignements que nous possédons à l'heure actuelle sur l'action de *P. roqueforti* sur la flore microbienne proviennent des travaux de Wilkowske et Krienke (1954) dont les résultats montrent que, dans les fromages bleus, *P. roqueforti* ne produit pas de substances antibiotiques.

Il nous a paru intéressant de rechercher si *P. roqueforti* avait une action sur l'évolution quantitative et qualitative de la flore mi-

crobienne du fromage de Roquefort. Pour cela, nous avons suivi deux fabrications traditionnelles de fromage de Roquefort, effectuées à partir du même lait ; dans l'une des fabrications, le développement du *Penicillium* était inhibé par addition au lait de 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole, dont les propriétés antifongiques ont été mises en évidence par Royse et *al.* (1963).

MATERIEL ET METHODES

Fabrication et affinage

Après mélange de 800 l de lait de brebis, 300 l ont été additionnés, juste avant l'emprésurage, de lactate de 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole à raison de 2 mg par ml de lait.

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

Des échantillons de fromage ont été prélevés aux différents stades de la fabrication et de l'affinage : a) caillé à la mise en moules ; b) 24 h après l'emprésurage ; c) 48 h après l'emprésurage (fromages en salle chaude à 18° C) ; d) avant salage (soit au 10^{me} j) ; e) après salage (soit au 16^{me} j) ; f) après 10 j d'affinage à 8-9° C (26^{me} j) ; g) après 20 j d'affinage à 8-9° C avant que les fromages soient mis sous feuille d'étain (36^{me} j) ; h) au 70^{me} jour et i) en fin d'affinage (104^{me} j). On prélevait chaque fois trois échantillons sur un fromage différent : 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 des échantillons

Un g de fromage, additionné d'environ 0,1 g de citrate trisodique stérile, était broyé dans un mortier et dilué avec 9 ml de solution stérile de Ringer au 1/4. Des dilutions décimales étaient faites ensuite dans la même solution de Ringer au 1/4. Les germes totaux étaient dénombrés sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 (concentration finale) ; les bactéries coliformes sur gélose au désoxycholate de sodium (Desoxycholate Agar Difco n° 420) ; les levures sur gélose à l'extrait de pomme de terre (Potato Dextrose Agar Difco n° 13) ajustée à pH 3,5 avec de l'acide tartrique ; les staphylocoques et les microcoques sur milieu de Chapman (Mannitol Salt Agar Difco n° 30)

et les entérocoques sur milieu de Packer (1943), modifié par Mossel et *al.* (1957).

Pour chaque échantillon, 5 à 10 colonies ont été repiquées à partir de chacun des différents milieux ; après purification, les souches étaient conservées à + 4° C sur gélose inclinée. Les techniques utilisées pour l'identification des staphylocoques et des microcoques, des streptocoques lactiques, des *Leuconostoc*, des entérocoques et des levures ont été décrites précédemment (Devoyod, 1969 a ; Devoyod et Muller, 1969 ; Devoyod, 1969 b ; Devoyod et Sponem, 1970).

Les mesures et analyses suivantes ont été effectuées sur les échantillons de fromage : mesure électrométrique du pH avec une électrode de verre et dosage des chlorures par la méthode de Wilster et *al.* (1937).

RESULTATS

Nous appelons « essai » la fabrication dans laquelle *P. roqueforti* était inhibé par le 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole et « témoin » la fabrication normale.

Le résultat du dénombrement des germes totaux, des bactéries coliformes, des microcoques-staphylocoques, des levures et des entérocoques au centre du fromage aux différents stades de la fabrication et de l'affinage est donné dans le tableau 1. Nos résultats montrent que quantitativement l'évolution des germes totaux, des entérocoques et des bactéries coliformes est la même dans les fromages « essais » et dans les fromages « témoins ». En ce qui concerne les levures et les microcoques-staphylocoques, on voit que, jusqu'à la fin du salage, l'évolution de ces micro-organismes est la même dans les deux fabrications. Après le salage, on constate une augmentation très nette, jusqu'à la mise des fromages sous feuille d'étain, des levures et des microcoques dans les fromages où *P. roqueforti* a été inhibé. Par contre, au cours de cette même période, dans les fromages « témoins », le nombre des levures varie peu et celui des microcoques diminue. Pour plus de clarté nous avons porté dans les figures 1 et 2 respectivement les courbes d'évolution des levures et des microcoques-staphylocoques au cours de la fabrication et de l'affinage.

Dans le tableau 2, nous avons porté les résultats du dénombrement des germes totaux, des bactéries coliformes, des microcoques-staphylocoques, des levures et des entérocoques à la surface du fromage de Roquefort. Nos résultats montrent que l'évolution quantitative de ces différents micro-organismes est la même dans les fromages « essais » et les fromages « témoins ».

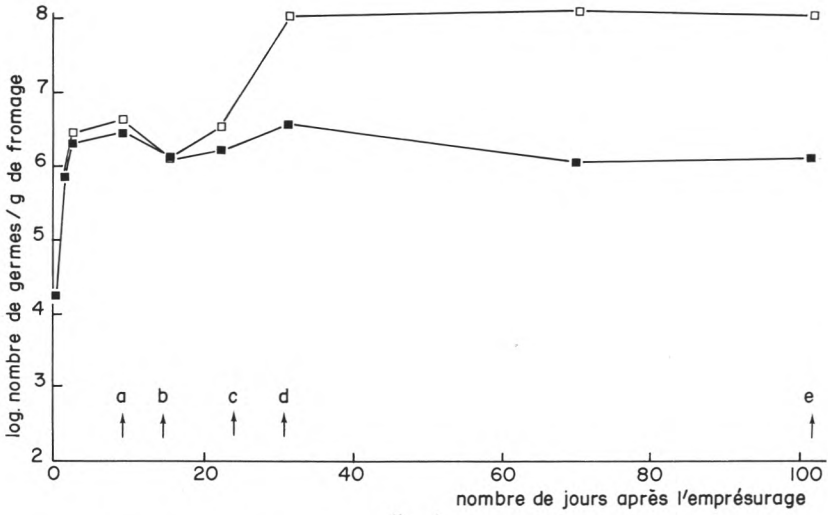


fig. 1

Evolution des levures au centre du fromage de Roquefort

- fabrication normale (témoïn).
- fabrication dans laquelle *P. roqueforti* a été inhibé (essai).
- a : avant salage.
- b : après salage.
- c : « pousse du bleu » dans les témoins.
- d : mise sous feuille d'étain.
- e : fin d'affinage.

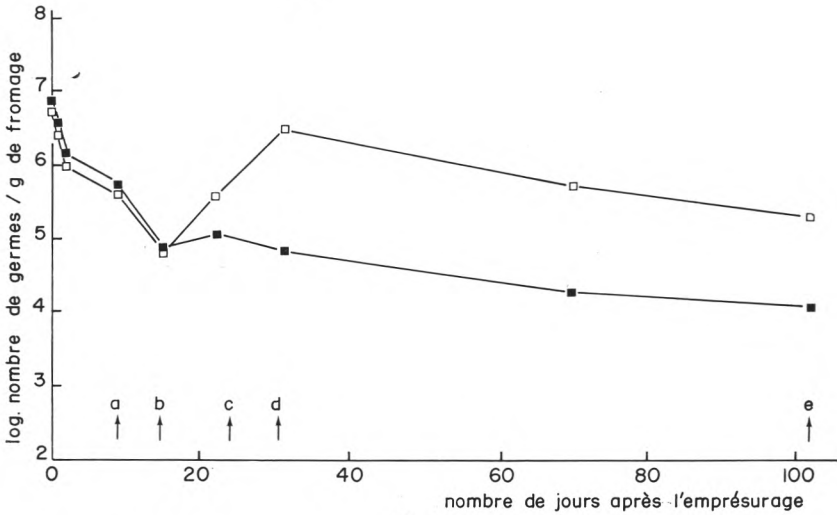


fig. 2

Evolution des micrococques au centre du fromage de Roquefort

- fabrication normale (témoïn).
- fabrication dans laquelle *P. roqueforti* a été inhibé (essai).
- a : avant salage.
- b : après salage.
- c : « pousse du bleu » dans les témoins.
- d : mise sous feuille d'étain.
- e : fin d'affinage.

TABLEAU 1. — Evolution de la flore microbienne au centre du fromage de Roquefort

Stades de la fabrication	Témoin (avec <i>Penicillium roqueforti</i>)					Essai (<i>Penicillium roqueforti</i> inhibé)				
	Flore totale	Bactéries coliformes	Levures	Microcoques et staphylocoques	Entérocoques	Flore totale	Bactéries coliformes	Levures	Microcoques et staphylocoques	Entérocoques
Caillé à la mise en moule	3 900	8,6	0,022	7	140	2 300	10,8	0,023	6,2	100
24 h après emprésurage ..	7 100	0,54	0,6	1,1	330	6 500	0,75	0,8	0,96	190
48 h après emprésurage ..	3 700	0,056	2,25	3,7	111	3 600	0,027	3,6	2,2	88
Avant salage (10 j après emprésurage)	3 300	(1)	3,6	0,53	50	4 500	(1)	4,6	0,45	25
Après salage (16 j après emprésurage)	180	(1)	1,7	0,12	53	190	(1)	1,2	0,09	64
10 j après salage (26 j après emprésurage)	800	(1)	1,8	0,07	67	580	(1)	3,3	0,37	72
Mise sous feuille d'étain (36 j après emprésurage)	1 000	(1)	1,6	0,07	64	800	(1)	110	3	35
70 j après emprésurage ..	3 700	(1)	1,5	0,019	50	3 000	(1)	150	0,5	28
Fin affinage (104 j après emprésurage)	500	(1)	1,2	0,012	48	350	(1)	120	0,2	23

Les résultats sont donnés en millions de germes par g de fromage.

(1) Moins de 10 bactéries coliformes/g de fromage.

TABLEAU 2. — Evolution de la flore microbienne à la surface du fromage de Roquefort

Stades de la fabrication	Témoin (avec <i>Penicillium roqueforti</i>)					Essai (<i>Penicillium roqueforti</i> inhibé)				
	Flore totale	Bactéries coliformes	Levures	Microcoques et staphylocoques	Entérocoques	Flore totale	Bactéries coliformes	Levures	Microcoques et staphylocoques	Entérocoques
24 h après emprésurage ..	7 000	5,9	7,7	1,3	320	4 400	2,6	3,5	3,7	170
48 h après emprésurage ..	3 500	0,36	9,6	0,7	78	4 800	0,16	10,4	2	73
Avant salage (10 j après emprésurage)	3 700	0,045	35	3,8	40	4 100	0,059	45	5	63
Après salage (16 j après emprésurage)	58	(1)	42	0,12	31	52	(3)	45	0,09	20
10 j après salage (26 j après emprésurage)	900	(2)	800	5,2	10	860	(2)	700	7,7	27
Mise sous feuille d'étain (36 j après emprésurage)	1 600	(2)	1 600	500	1	1 500	(2)	1 100	700	4
70 j après emprésurage ..	900	(2)	800	450	7,4	1 000	(2)	900	400	6,3
Fin affinage (104 j après emprésurage)	620	(2)	460	300	6,4	780	(2)	620	380	3,4

Les résultats sont donnés en millions de germes par g de fromage.

(1) 120 bactéries coliformes/g de fromage.

(2) Moins de 10 bactéries coliformes/g de fromage.

(3) 30 bactéries coliformes/g de fromage.

TABLEAU 3

Valeurs de pH et teneurs en chlorure de sodium à la surface et au centre des fromages après le salage et au cours de l'affinage

	« Essai »				« Témoin »			
	Surface		Centre		Surface		Centre	
	pH	ClNa	pH	ClNa	pH	ClNa	pH	ClNa
Après salage (16 ^{me} j)	4,90	4,9	4,86	2,8	4,92	4,8	4,82	2,9
10 j affinage (26 ^{me} j)	5,48	4,5	5,04	3,1	5,35	4,5	5,24	3,1
20 j affinage (36 ^{me} j)	6,14	4,3	5,28	3,4	6,08	4,4	5,60	3,4
70 ^{me} j	6,26	4,2	5,42	3,5	6,18	4,2	5,74	3,5
Fin affinage (104 ^{me} j)	6,30	3,8	5,50	4,0	6,24	4,0	5,66	3,9

Les teneurs en ClNa sont données en p. 100 de fromage.

Dans la fabrication « témoin », le dénombrement des principaux micro-organismes a donné des résultats comparables à ceux obtenus antérieurement (Devoyod et Bret, 1966 ; Devoyod et *al.*, 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.

L'étude des caractères biochimiques des souches isolées aux mêmes stades de la fabrication et de l'affinage n'a montré aucune différence entre les souches provenant des fromages « essais » et celles isolées des fromages « témoins ». Ce résultat semble indiquer que *P. roqueforti* n'a aucune action sur l'évolution qualitative de la flore microbienne du fromage de Roquefort.

Le fait que l'évolution de la flore microbienne jusqu'au salage est la même dans les deux fabrications permet de penser que le 2-(4-Thiazolyl) Benzimidazole n'a aucune action vis-à-vis des germes totaux, des bactéries coliformes, des microcoques-staphylocoques, des levures et des entérocoques.

Dans le tableau 3, nous avons porté les valeurs de pH et les teneurs en chlorure de sodium des fromages après le salage et au cours de l'affinage. On constate que le pH au centre du fromage remonte moins rapidement lorsque *P. roqueforti* est inhibé.

DISCUSSION

Nos résultats ont montré qu'en l'absence de *P. roqueforti*, les levures et les microcoques se multipliaient au centre du fromage après le salage, tandis qu'en présence du *Penicillium* le nombre de ces micro-organismes variait peu durant cette période. Les levures que l'on trouve au centre du fromage, *Torulopsis candida* et *Torulopsis famata* essentiellement, sont acidophiles et peuvent se développer en présence de 10 à 12 p. 100 de chlorure de sodium (Devoyod et Sponem, 1970) ; ce sont donc des micro-organismes très bien adaptés pour se développer, comme le *Penicillium*, en milieu acide et salé. On peut donc admettre qu'il y a dans le fromage de Roquefort compétition entre les levures et le *Penicillium* ; en l'absence de ce dernier, les levures peuvent se développer sans être gênées par les autres micro-organismes qui constituent la flore microbienne du fromage.

En ce qui concerne les microcoques, les causes de leur développement après salage au centre du fromage ne sont vraisemblablement pas de même nature que pour les levures. En effet, bien que résistants au sel, les microcoques isolés après salage sont peu acidophiles. Après salage, le pH au centre du fromage était de 4,8 (pH qui était le même dans les « essais » et les « témoins ») ; les microcoques isolés d'échantillons prélevés au centre à ce stade ne se déve-

loppaient que lentement à ce pH or, dans les fromages « essais », le nombre de ces micro-organismes passe de 90 000 à 3 millions. Il est permis de penser que le développement des microcoques est une conséquence du développement des levures, ces dernières apportant vraisemblablement aux microcoques des facteurs de croissance qui leur permettent de se développer à bas pH. Le développement des microcoques au centre du fromage après salage serait une conséquence indirecte de l'absence du *Penicillium*.

La stimulation des microcoques par les levures semble être un phénomène assez général que l'on rencontre dans d'autres fromages que le Roquefort (Kelly, 1937 ; Macy et Erekson, 1937 ; Langhus et al., 1945 ; Hartley et Jezeski, 1954 ; Kanaushi et al., 1962). Les substances responsables de cette stimulation sont actuellement à l'étude.

Remerciements

Nous remercions M. Bret, ancien Directeur du Laboratoire de la Société des Caves de Roquefort pour la collaboration qu'il nous a apporté dans la réalisation de notre étude. Nous remercions vivement M. Assénat pour les analyses effectuées dans son laboratoire. Nos remerciements vont également à M. Auclair pour ses suggestions et ses critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans la présentation de ce travail.

Résumé

L'action de *Penicillium roqueforti* sur l'évolution de la flore microbienne du fromage de Roquefort a été étudiée. L'évolution des principaux micro-organismes qui constituent la flore microbienne a été suivie au cours de deux fabrications de fromages de Roquefort faites à partir du même lait ; dans l'une d'elle *P. roqueforti* était inhibé par le lactate de 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole.

En l'absence de tout développement du *Penicillium*, on constate une multiplication des levures et un développement des microcoques au centre du fromage.

Summary

Microbial associations in Roquefort cheese

II. Action of Penicillium roqueforti on microbial flora

The action of *Penicillium roqueforti* on the evolution of microbial flora in Roquefort cheese was studied. The evolution of the flora was followed in two batches of Roquefort cheese made from the same ewe's milk ; in one batch, *P. roqueforti* was inhibited by 2-(4'-Thiazolyl) Benzimidazole lactate.

When *Penicillium* is inhibited, yeasts and micrococci grow in the inner part of the cheese after salting.

Reçu pour publication en juillet 1970.

Références bibliographiques

- [1] BAKALOR (S.) (1962). — Research related to the manufacture of blue-veined cheese. Part I. *Dairy Sci. Abstr.*, 24, 529.
- [2] CLARKE (J.) and GOLDING (N. S.) (1949). — A comparison of starters for use in Roquefort type cheese. *Nat. Butt. Cheese J.*, 40, 27.
- [3] DEVOYOD (J. J.) (1969 a). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. II. Staphylocoques et microcoques. *Le Lait*, 481-482, 1.
- [4] DEVOYOD (J. J.) (1969 b). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Le Lait*, 489-490, 637.
- [5] DEVOYOD (J. J.) et BRET (G.) (1966). — Evolution de la flore microbienne au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort. XVII^e Cong. Int. Laiterie, D-2, 585.
- [6] 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 du fromage. *Le Lait*, 479-480, 613.
- [7] 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.
- [8] DEVOYOD (J. J.) et SPONEM (D.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Le Lait*, 498, 524.
- [9] HARTLEY (C. B.) et JEZESKI (J. J.) (1954). — The microflora of blue cheese slime. *J. Dairy Sci.*, 37, 1316.
- [10] KANAUSHI (T.), YOSHIOKA (Y.) and HAMAMOTO (M.) (1962). — Microbial studies in blue veined cheese. I. Microflora of blue veined cheese in ripening period. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 32, 104.
- [11] KELLY (C. D.) (1937). — The microbial flora on the surface of Limburger cheese. *J. Dairy Sci.*, 20, 239.
- [12] LANGHUS (W. L.), PRICE (W. V.), SOMMER (H. H.) and FRAZIER (W. C.) (1945). — The « smear » of brick cheese and its relation to flavor development. *J. Dairy Sc.*, 28, 827.
- [13] MACY (H.) and EREKSON (J. A.) (1937). — Microflora of cheese slime. *J. Dairy Sci.*, 20, 464.
- [14] MOCQUOT (G.) and BEJAMBES (M.) (1960). — Technology of ewe's and goat's milk products. I. Ewe's milk products. *Dairy Sci. Abstr.*, 22, 1.
- [15] MOSSEL (D. A. A.), VAN DIEPEN (H. M. J.) and DE BRUIN (A. S.) (1957). — The enumeration of faecal streptococci in foods using Packer's crystal violet sodium azide blood agar. *J. appl. Bact.*, 20, 265.
- [16] PACKER (R. A.) (1943). — The use of sodium azide (NaN₃) and crystal violet in a selective medium for streptococci and *Erysipelthrix rhusiopathiae*. *J. Bact.*, 46, 343.
- [17] PROKS (J.), DOLEZALEK (J.) and PECH (Z.) (1959). — A study of the coaction of the yeasts of the genus *Torulopsis* on the formation of methyl ketones in the cheese of Roquefort type. *Int. Dairy Cong.*, 2, 729.
- [18] ROYSE (H. H.), WAGNER (J. R.) and HUMPHREYS (T. W.) (1963) cités par ROBINSON (H. J.), PHARES (H. F.) and GRAESSLE (O. E.) (1964). — Antimycotic properties of thiabendazole. *J. invest. Dermatol.*, 42, 479.
- [19] WILKOWSKE (H. H.) et KRIENKE (W. A.) (1954). — Assay of various mold-ripened cheeses for antibiotic activity. *J. Dairy Sci.*, 37, 1184.
- [20] WILSTER (G. H.), PRICE (W. V.), MURRIS (A. J.), GOSS (E. F.) and SANDERS (G. P.) (1937). — Determination of fat, moisture and salt in hard cheese. *J. Dairy Sci.*, 20, 27.