

La flore lactique du fromage bleu de Cabrales

par

M. NUÑEZ et Margarita MEDINA

*Departamento de Bioquímica y Microbiología. CRIDA 06
Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias
Apdo, 8111 Madrid*

INTRODUCTION

Le fromage de Cabrales est le plus réputé des fromages persillés produits en Espagne. Il est fabriqué à partir de lait cru de vache, mélangé avec des petites quantités de lait de brebis et de chèvre, sans utiliser de levains lactiques ou fongiques. On a suivi l'évolution de sa flore microbienne (Nunez, 1978) et on a constaté que les streptocoques lactiques sont les micro-organismes dominants en surface et à l'intérieur du fromage pendant la fabrication, le salage (3^e et 4^e j) et le premier affinage (du 5^e au 15^e j). Le deuxième affinage se poursuit pendant 3 à 4 mois en grottes naturelles dont la température est de 9 à 10° C et l'humidité de 90 à 95 p. 100 : après le 30^e j de maturation les lactobacilles, les levures et les moisissures dominent à l'intérieur du fromage et les microcoques en surface.

La flore lactique du fromage de Roquefort est bien connue : Devoyod et Muller (1969) ont étudié les streptocoques lactiques et les leuconostocs et il y a aussi des travaux publiés sur les entérocoques (Devoyod, 1969) et les lactobacilles (Devoyod, 1970). En ce qui concerne le fromage de Cabrales, les lactobacilles sont le seul genre des bactéries lactiques qui a fait l'objet d'une étude (Burgos *et al.*, 1971). Ces auteurs ont mentionné *Lactobacillus casei* comme l'espèce dominante sur 6 souches isolées de lactobacilles.

Au cours du présent travail nous avons recherché à identifier les principales espèces des bactéries lactiques trouvées dans le fromage de Cabrales et étudié quelques caractères physiologiques qui peuvent présenter un intérêt en technologie fromagère.

MATERIEL ET METHODES

Dénombrements et isolements des souches

Nous avons suivi l'évolution de la flore lactique au cours de deux fabrications traditionnelles (A et B) de fromage de Cabrales. La méthode de fabrication du fromage et les techniques et milieux utilisés pour les dénombrements des streptocoques, leuconostocs et lactobacilles ont été décrits précédemment (Nunez, 1978.)

Les échantillons de lait ont été prélevés avant l'emprésurage, les échantillons de caillé avant la mise en moules et les échantillons de la surface et de l'intérieur du fromage les 4^e, 15^e, 30^e, 60^e, 90^e et 120^e j après l'emprésurage. Pour chaque échantillon, 4 à 10 colonies à partir de chacun des milieux ont été repiquées sur gélose M.R.S. (De Man *et al.*, 1960). Après purification, les souches étaient conservées à -30° C sur bouillon M.R.S. (0,5 ml de culture de 16 h sur 4,5 ml de bouillon).

Identification des souches

Pour séparer les différents genres des bactéries lactiques on a d'abord étudié les caractères suivants :

1. Morphologie

L'examen microscopique des souches isolées et leur coloration de Gram ont été effectués sur une culture de 16 h à 30° C sur bouillon M.R.S.

2. Production de catalase

Une goutte de H₂O₂ à 10 volumes était déposée sur une colonie de 48 h sur gélose M.R.S.

3. Production de CO₂ à partir du glucose

On l'a observée sur bouillon M.R.S. avec bouchon de gélose double incubé 7 j à 30° C.

4. Désamination de l'arginine

Le bouillon d'Elliker *et al.* (1956) additionné de L-monochlorhydrate d'arginine à 0,3 p. 100 de concentration finale a été utilisé. La lecture du résultat se faisait en ajoutant une goutte de réactif de Nessler à une goutte de culture de 72 h à 30° C.

On a de suite identifié les souches appartenant aux trois genres trouvés, d'après le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan et Gibbons, 1974), par l'examen des caractères suivants :

a) STREPTOCOQUES

1. *Croissance à différentes températures*

Le développement bactérien sur bouillon d'Elliker était apprécié après 48 h pour les cultures incubées à 40° C, 45° C et 50° C et après 7 j pour les cultures incubées à 10° C.

2. *Croissance en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène*

On a utilisé de la poudre de lait écrémé reconstitué à 10 p. 100 à l'aide de l'eau distillée et additionnée de bleu de méthylène à une concentration finale de 0,1 p. 100.

3. *Croissance en présence de 4 p. 100 et 6,5 p. 100 de NaCl*

Les souches étaient ensemencées dans le bouillon d'Elliker additionné de NaCl (concentrations finales : 4 p. 100 et 6,5 p. 100) et examinées après 48 h à 30° C.

4. *Croissance en présence de 0,04 p. 100 de tellurite de potassium*

Le milieu Tryptose Blood Agar Base (Difco) contenant 0,04 p. 100 de tellurite de potassium (concentration finale) coulé en boîtes de Pétri et ensemencé en surface a été utilisé.

5. *Croissance à pH 9,6*

Les souches étaient cultivées à 30° C sur le milieu de Shattock et Hirsch (1947) et examinées après 24 h.

6. *Résistance à un chauffage de 60° C pendant 30 mn*

La méthode décrite par Sandine *et al.* (1962) a été utilisée.

7. *Action sur le lait tournesolé*

La réduction, acidification et coagulation étaient notées après 7 j d'incubation à 30° C.

8. *Hydrolyse de la gélatine*

La recherche de l'hydrolyse de la gélatine a été faite selon la méthode de Frazier (1926).

9. *Production de CO₂ à partir du citrate*

Le milieu utilisé était du bouillon de Reddy *et al.* (1971). Les cultures ont été incubées 72 h à 30° C.

10. *Production de diacétyle à partir du glucose*

La production de diacétyle à partir du glucose était décelée selon la méthode de Barritt (1936), après 48 h et 7 j d'incubation à 30° C sur un bouillon de composition : peptone 1 p. 100 ; glucose 0,5 p. 100 ; pH 7,0.

11. *Fermentation des sucres*

Les souches étaient cultivées pendant 14 j à 30° C sur un bouillon de composition : peptone 1 p. 100 ; NaCl 0,5 p. 100 ; pourpre de bromocrésol 0,004 p. 100 ; pH 7,0. La concentration finale en hydrates de carbone était de 0,5 p. 100.

12. *Activité acidifiante*

La mesure de l'activité acidifiante a été faite selon la méthode décrite par Devoyod et Muller (1969).

b) LEUCONOSTOCS

1. *Production de dextrane*

Le milieu de Garvie (1960) a été utilisé. La lecture du résultat se faisait après 5 j d'incubation à 22° C.

2. *Hydrolyse de l'esculine*

Le bouillon de Naylor et Sharpe (1958) était incubé 7 j à 22° C. On décelait l'hydrolyse de l'esculine par le noircissement du milieu et par la perte de fluorescence en lumière ultra-violette.

3. *Production de diacétyle à partir du citrate*

Après 48 h et 7 j d'incubation à 22° C sur bouillon d'Elliker additionné de citrate trisodique (concentration finale : 0,5 p. 100) la présence du diacétyle était décelée selon Barritt (1936).

4. *Croissance à pH initial 4,8 et 6,5*

On a suivi la méthode décrite par Garvie (1967).

5. *Croissance en présence de 3 p. 100 et 6,5 p. 100 de NaCl*

Le bouillon d'Elliker additionné de NaCl (concentrations finales 3 p. 100 et 6,5 p. 100) était incubé 3 j à 22° C.

6. *Croissance à 37° C*

Le développement bactérien sur bouillon d'Elliker était observé après 3 j à 37° C.

7. *Fermentation des sucres*

La fermentation des sucres a été faite selon la méthode décrite par Garvie (1967).

c) LACTOBACILLES

1. *Croissance à différentes températures*

Le développement des souches sur bouillon M.R.S. était noté après 7 j d'incubation pour les cultures à 45° C et après 14 j pour les cultures à 15° C.

2. Production de diacétyle à partir du citrate

On a suivi la méthode décrite ci-dessus pour les leuconostocs.

3. Hydrolyse de l'esculine

On a suivi la méthode décrite préalablement pour les leuconostocs.

4. Fermentation des sucres

Le milieu utilisé était le bouillon M.R.S. exempt de glucose et d'extrait de viande avec 0,004 p. 100 de rouge de chlorophénol et une concentration finale en hydrates de carbone de 2 p. 100. Les cultures ont été incubées 14 j à 30° C.

5. Acidité titrable

L'acidité produite pendant 7 j d'incubation à 30° C sur lait écrémé reconstitué à 10 p. 100 était titrée sur 9 g de culture à l'aide de NaOH 0,1 N en présence de phénolphtaléine.

Croissance des bactéries lactiques à différentes concentrations de chlorure de sodium

Les temps de génération de 12 streptocoques, 12 leuconostocs et 12 lactobacilles sur bouillon M.R.S. additionné de NaCl à différentes concentrations ont été déterminés à l'aide d'un biophotomètre enregistreur Jobin-Yvon.

RESULTATS

Identification de la flore lactique

Lors de notre étude, 261 souches de bactéries lactiques ont été isolées du lait, du caillé et du fromage de Cabrales au cours de l'affinage. Parmi ces souches, 85 ont été identifiées comme étant des streptocoques, 59 comme des leuconostocs et 117 comme des lactobacilles. Nous n'avons pas mis en évidence la présence de pédiocoques. La répartition des différentes espèces de bactéries lactiques isolées des deux fabrications est indiquée dans le tableau 1.

a) CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DES STREPTOCOQUES

Les caractères biochimiques des streptocoques sont donnés dans le tableau 2. Cinquante-quatre souches de streptocoques correspondaient à la description de l'espèce *Streptococcus lactis* : ces bactéries se développaient à 10° C et à 40° C et en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène et de 4 p. 100 de NaCl, désaminaient l'arginine et fermentaient le maltose et le lactose; elles ne poussaient pas à 45° C, à pH 9,6 ni en présence de 6,5 p. 100 de NaCl et ne produisaient pas de CO₂ à partir du citrate ni du diacétyle à partir du glucose.

TABLEAU 1

Répartition des bactéries lactiques isolées du fromage de Cabrales

Espèce	Fabrication A			Fabrication B		
	L + C	I	E	L + C	I	E
<i>Streptococcus lactis</i>	12	12	5	11	4	10
<i>Str. lactis</i> atypiques	3	5	—	3	7	1
<i>Str. faecium</i>	—	—	1	—	3	—
<i>Str. faecalis</i>	—	—	—	—	—	1
<i>Str. acidominimus</i>	—	—	2	—	—	—
<i>Str. acidominimus</i> atypiques	—	—	5	—	—	—
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	—	3	1	6	7	10
<i>L. lactis</i>	—	—	1	3	1	1
<i>L. mesenteroides</i>	2	2	1	1	1	1
<i>L. paramesenteroides</i>	2	4	7	4	1	—
<i>Lactobacillus plantarum</i>	13	27	17	6	28	15
<i>L. plantarum</i> atypiques	—	2	—	—	—	—
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	—	—	2	—	—	4
<i>L. casei</i> subsp. <i>rahamnosus</i>	—	—	—	—	1	1
<i>L. brevis</i>	—	1	—	—	—	—

L + C : lait + caillé ; I : intérieur ; E : extérieur.

Dix-neuf souches de streptocoques lactiques ont été considérées comme des souches atypiques de l'espèce *Str. lactis* : deux souches ne produisaient pas d'acide à partir du maltose ; une souche ne se développait pas à 40° C ; une autre souche ne poussait pas en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène ; trois souches ne produisaient pas de l'ammoniaque à partir de l'arginine ; 6 souches ne désaminaient pas l'arginine et ne se développaient pas en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène ; deux souches se développaient en présence de 6,5 p. 100 de NaCl, ne désaminaient pas l'arginine et ne se développaient pas en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène ; 4 souches se développaient à pH 9,6. Les autres caractères biochimiques correspondaient à ceux de *Str. lactis*.

Cinq souches d'entérocoques ont été isolées sur le milieu de Kenner *et al.* (1961), où ils sont trouvés occasionnellement en faible nombre (10^2 — 10^3 /g de fromage) au cours de la maturation. Les 5 souches se développaient à 10° C, à 45° C et à pH 9,6, poussaient en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène et de 6,5 p. 100 de NaCl,

TABLEAU 2

Caractères biochimiques des streptocoques isolés du fromage de Cabrales

Espèce	<i>Str. lactis</i>	<i>Str. lactis atypiques</i>	<i>Str. faecium</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. acidominimus</i>	<i>Str. acidominimus atypiques</i>
Nombre de souches	54	19	4	1	2	5
Croissance à 10° C	+	+	+	+	—	—
Croissance à 40° C	+	18/19	+	+	—	—
Croissance à 45° C	—	—	+	+	—	—
Croissance à pH 9,6	—	4/19	+	+	—	—
Croissance 4 p. 100 NaCl	+	+	+	+	+	+
Croissance 6,5 p. 100 NaCl	—	2/19	+	+	—	—
Croissance 0,1 p. 100 B.M.	+	6/19	+	+	—	—
Croissance 0,04 p. 100 tellurite	N.E.	N.E.	—	+	N.E.	N.E.
Résistance 60° C/30 mn	50/54	17/19	+	+	+	3/5
A.R.C. lait tournesolé	48/54	17/19	+	+	—	—
Hydrolyse de la gélatine	N.E.	N.E.	—	—	N.E.	N.E.
Désamination de l'arginine	+	4/19	+	+	—	—
Gaz à partir du citrate	—	—	—	—	—	1/5
Diacétyle à partir du glucose	—	—	—	—	—	—
Fermentation de l'arabinose	12/54	11/19	2/4	+	—	3/5
Fermentation du lactose	+	+	+	+	—	—
Fermentation du maltose	+	17/19	+	+	+	4/5
Fermentation du mannitol	23/54	15/19	2/4	+	+	2/5
Fermentation du mélézitose	17/54	12/19	—	+	+	2/5
Fermentation du mélibiose	3/54	13/19	2/4	—	+	1/5
Fermentation du sorbitol	2/54	10/19	—	+	—	—

N.E. : non essayée.

B.M. : bleu de méthylène.

A.R.C. : acidification, réduction et coagulation.

Fraction : nombre de souches positives / nombre de souches essayées.

produisaient de l'ammoniaque à partir de l'arginine et résistaient à un chauffage de 60° C pendant 30 mn. Elles ne produisaient pas du CO₂ à partir du citrate ni du diacétyle à partir du glucose. Quatre souches ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Str. faecium* : elles ne se développaient pas à 50° C ni en présence de 0,04 p. 100 de tellurite de potassium et ne produisaient pas d'acide à partir du mélézitose ni du sorbitol. La souche restante correspondait à la description de *Str. faecalis*. Elle n'hydrolysait pas la gélatine.

Deux souches correspondaient à la description de *Str. acidominimus* : elles ne poussaient pas à 10° C ni à 45° C, ne désaminaient pas l'arginine, ne se développaient pas en présence de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène, de 6,5 p. 100 de NaCl ni à pH 9,6, n'étaient pas hémolytiques et ne fermentaient pas le glycérol. Cinq souches ont été considérées comme des souches atypiques de l'espèce *Str. acidominimus* : elles n'hydrolysaient pas l'hippurate.

Les 7 souches de *Str. acidominimus* ont été isolées à la surface du fromage A le 90° et le 120° j après l'emprésurage. Leur pH final dans bouillon glucosé était 5,50-6,15.

Les activités acidifiantes des streptocoques sont indiquées dans le tableau 3. Les 8 souches les plus acidifiantes ont été isolées de la fabrication B, à partir du lait, du caillé et du fromage pendant le premier mois d'affinage.

TABLEAU 3

Activité acidifiante des streptocoques isolés du fromage de Cabrales

Espèce	Nombre de souches	Acidité après 6 h à 30° C			
		≤ 20° D	21-25° D	26-30° D	31-35° D
<i>Streptococcus lactis</i>	54	—	28	19	7
<i>Str. lactis</i> atypiques	19	—	15	3	1
<i>Str. faecium</i>	4	—	4	—	—
<i>Str. faecalis</i>	1	—	1	—	—
<i>Str. acidominimus</i>	2	2	—	—	—
<i>Str. acidominimus</i> atypiques	5	5	—	—	—

b) CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DES LEUCONOSTOCS

Les caractères biochimiques des leuconostocs sont donnés dans le tableau 4. Vingt-sept souches sur les 59 isolées peuvent être considérées comme appartenant à l'espèce *Leuconostoc dextranicum* : elles produisaient des dextrans à partir du saccharose, fermentaient le lactose et ne fermentaient pas l'arabinose. La majeure partie de ces

TABLEAU 4

Caractères biochimiques des leuconostocs isolés du fromage de Cabrales

Espèce	<i>L. dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. paramesenteroides</i>	<i>L. lactis</i>
Nombre de souches	27	8	18	6
Gaz à partir du glucose	+	+	+	+
Désamination de l'arginine	—	—	—	—
Production de dextrane	+	+	—	—
Croissance à 37° C	+	+	+	2/6
Croissance 3 p. 100 NaCl	+	+	+	+
Croissance 6,5 p. 100 NaCl	—	—	4/18	—
Croissance pH initial 4,8	9/27	1/8	4/18	—
Croissance pH initial 6,5	+	+	+	+
Diacétyle à partir du citrate	—	—	—	—
Hydrolyse de l'esculine	2/27	+	2/18	—
Fermentation de l'arabinose	—	+	1/18	—
Fermentation du glucose	+	+	+	+
Fermentation du lactose	+	+	+	+
Fermentation du maltose	22/27	+	+	+
Fermentation du saccharose	26/27	+	16/18	+
Fermentation de la salicine	5/27	+	2/18	—
Fermentation du tréhalose	26/27	7/8	+	—

Fraction : nombre de souches positives / nombre de souches essayées.

souches produisaient de l'acide à partir du maltose, du saccharose et du tréhalose, ne fermentaient pas la salicine et n'hydrolysaient pas l'esculine.

Huit souches correspondaient à la description de l'espèce *L. mesenteroides* : elles produisaient des dextrans, hydrolysaient l'esculine et fermentaient l'arabinose, le lactose, le maltose, le saccharose, la salicine et le tréhalose.

Dix-huit souches ont été identifiées comme *L. paramesenteroides* : elles ne formaient pas des dextrans, ne produisaient pas du diacétyle et fermentaient le lactose, le maltose, le saccharose et le tréhalose.

Les 6 souches restantes appartenaient à l'espèce *L. lactis* : elles ne formaient pas des dextrans, ne produisaient pas du diacétyle et fermentaient le lactose, le maltose et le saccharose.

c) CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DES LACTOBACILLES

Les caractères biochimiques des lactobacilles sont indiqués dans le tableau 5. Cent-six souches correspondaient à la description de *Lactobacillus plantarum* : elles hydrolysaient l'esculine et produisaient de l'acide à partir du cellobiose, du lactose, du maltose, du mélézitose, du mélibiose, du raffinose, du ribose, du saccharose et de la salicine. Deux souches ont été considérées comme *L. plantarum* atypiques : elles fermentaient le mélibiose et le raffinose mais ne fermentaient pas le cellobiose, le mélézitose, le saccharose et la salicine.

Six souches ont les caractères de *L. casei* subsp. *casei* : elles produisaient de l'acide à partir du cellobiose, du lactose, du maltose,

TABLEAU 5

Caractères biochimiques des lactobacilles isolés du fromage de Cabrales

Espèce	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> atypiques	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>L. brevis</i>
Nombre de souches	106	2	6	2	1
Croissance à 15° C	+	+	+	+	+
Croissance à 45° C	85/106	—	—	—	—
Gaz à partir du glucose	—	—	—	—	+
Désamination de l'arginine	—	—	—	—	+
Diacétyle à partir du citrate	69/106	—	1/6	—	—
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+	+	—
Fermentation du cellobiose	+	—	+	1/2	—
Fermentation du glucose	+	+	+	+	+
Fermentation du lactose	+	+	+	+	+
Fermentation du maltose	+	+	+	+	+
Fermentation du mélézitose	+	—	+	1/2	—
Fermentation du mélibiose	+	+	—	—	+
Fermentation du raffinose	+	+	—	—	—
Fermentation du rhamnose	35/106	—	—	+	—
Fermentation du ribose	+	+	+	+	+
Fermentation du saccharose	+	—	4/6	—	—
Fermentation de la salicine	+	—	5/6	1/2	—
Fermentation du xylose	—	+	—	1/2	+

Fraction : nombre de souches positives / nombre de souches essayées.

du mélézitose, du ribose et la majeure partie du saccharose et de la salicine. Deux souches peuvent être considérées comme appartenant à *L. casei* subsp. *rhamnosus* : elles fermentaient le rhamnose. Une souche a été classée comme *L. brevis* : elle produisait du CO₂ à partir du glucose, désaminait l'arginine et fermentait le lactose, le maltose, le mélibiose, le ribose et le xylose.

L'acidité titrable des lactobacilles est donnée dans le tableau 6. La majeure partie des souches de *L. plantarum* peu acidifiantes (32/38 soit 84 p. 100) ont été isolées du fromage B.

TABLEAU 6

Acidité titrable des lactobacilles isolés du fromage de Cabrales

Espèce	Nombre de souches	Acidité (° D) après 7 j à 30° C				
		20-50	51-80	81-110	111-140	141-170
<i>L. plantarum</i>	106	38	5	41	17	5
<i>L. plantarum</i> atypiques	2	2	—	—	—	—
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	6	2	2	—	1	1
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	2	1	1	—	—	—
<i>L. brevis</i>	1	1	—	—	—	—

d) CROISSANCE DES BACTÉRIES LACTIQUES A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE SODIUM

Nous avons déterminé les temps de génération de 36 souches de bactéries lactiques, 18 isolées au centre du fromage et 18 isolées à la surface, en bouillon M.R.S. additionné de NaCl à différentes concentrations. Sur le tableau 7, on a indiqué la moyenne des temps de génération pour les souches appartenant à chaque espèce en présence des différentes concentrations de NaCl.

TABLEAU 7

Temps de génération des principales espèces de bactéries lactiques isolées du fromage de Cabrales en présence de différentes concentrations de NaCl

Espèce	Nombre de souches	Moyenne des temps de génération (mn) à différentes concentrations de NaCl						Rapport 5 p. 100/ 0 p. 100
		0 p. 100	1 p. 100	2 p. 100	3 p. 100	4 p. 100	5 p. 100	
Intérieur :								
<i>Str. lactis</i>	5	76,2	106,6	108,0	109,6	152,1	255,4	3,35
<i>Str. faecium</i>	1	76,5	96,0	103,5	101,0	120,0	180,0	2,35
<i>Leuc. dextranicum</i>	4	129,5	118,7	138,5	174,5	204,5	289,7	2,24
<i>Leuc. paramesenteroides</i>	1	105,0	87,0	78,0	102,0	133,0	163,0	1,55
<i>Leuc. lactis</i>	1	141,0	111,0	210,0	300,0	387,0	591,0	4,19
<i>Lb. plantarum</i>	6	111,5	111,0	95,8	109,0	126,1	223,5	2,00
Extérieur :								
<i>Str. lactis</i>	5	72,9	96,6	106,8	135,3	190,4	409,0	5,61
<i>Str. faecalis</i>	1	76,5	81,0	91,5	84,0	117,0	174,0	2,27
<i>Leuc. dextranicum</i>	4	101,2	79,7	118,0	149,5	226,7	271,5	2,68
<i>Leuc. lactis</i>	2	91,5	75,0	108,0	132,0	340,5	531,0	5,80
<i>Lb. plantarum</i>	3	97,0	90,3	79,0	99,0	99,0	187,0	1,93
<i>Lb. casei</i>	3	163,0	147,0	172,0	209,0	231,3	443,3	2,72

DISCUSSION

a) LES STREPTOCOQUES

Nos résultats ont montré que *Streptococcus lactis* est l'espèce dominante des streptocoques lactiques et du genre *Streptococcus* dans le fromage de Cabrales. L'espèce *Str. cremoris* n'a pas été isolée, contrairement à ce que Devoyod et Muller (1969) ont trouvé dans le fromage de Roquefort où elle représente 24 p. 100 des streptocoques lactiques. Pourtant, nous avons identifié 19 souches de streptocoques lactiques avec quelques caractères de *Str. cremoris* mais qui ont été considérées comme des souches atypiques de *Str. lactis*. Cavett et Garvie (1967) et Orvin Mundt (1976) ont étudié aussi des souches atypiques de *Str. lactis*.

Les souches de streptocoques lactiques isolées du fromage de Cabrales sont en général des germes d'acidification lente : seulement 8/73 soit 11 p. 100, produisaient plus de 30° D en 6 h.

En ce qui concerne les entérocoques, nous avons constaté qu'ils sont rencontrés occasionnellement à la surface et au centre du fromage, *Str. faecium* étant l'espèce dominante. Leur faible nombre restreint leur action stimulante vis-à-vis de la croissance des streptocoques lactiques et des leuconostocs montrée par Devoyod et Muller (1969) et Devoyod et Desmazeaud (1970).

Nous croyons que c'est la première fois qu'on isole *Str. acidominimus* à partir d'un fromage. Cependant il avait déjà été isolé à partir du lait cru.

D'après nos résultats (tab. 7), les streptocoques étaient, parmi les bactéries lactiques, le genre le plus sensible au chlorure de sodium si on considère le rapport « temps de génération avec 5 p. 100 NaCl/temps de génération avec 0 p. 100 NaCl » : il était en moyenne de 3,18 pour 6 souches de l'intérieur du fromage et de 5,03 pour 6 souches de l'extérieur.

Str. lactis était l'espèce la moins résistante : le rapport est en moyenne de 3,35 pour 5 souches de l'intérieur et de 5,61 pour 5 souches de l'extérieur, contrairement à ce qu'on pouvait attendre compte tenu de la forte teneur en chlorure de sodium à la surface du fromage. Les entérocoques ont les rapports les plus bas : 2,35 pour *Str. faecium* et 2,27 pour *Str. faecalis*, conformément à leur halotolérance.

b) LES LEUCONOSTOCS

Les espèces les plus fréquemment retrouvées étaient *Leuconostoc dextranicum* et *L. paramesenteroides*, ce qui coïncide avec les résultats signalés pour un autre fromage espagnol, le Manchego, par Nunez (1976). Seulement 10 p. 100 des souches ont été identifiées comme *L. lactis* et l'espèce *L. cremoris* n'a pas été isolée. Ces données

sont analogues à celles obtenues par Devoyod et Muller (1969) pour le fromage de Roquefort.

Aucune des 59 souches de leuconostocs étudiées n'était capable de produire du diacétyle à partir du citrate. En outre, la population de leuconostocs à l'intérieur du fromage reste toujours inférieure à $10^7/g$ (Nunez, 1978), nombre insuffisant pour jouer un rôle important dans l'ouverture du fromage. L'intérêt technologique des bactéries du genre *Leuconostoc* dans la fabrication du fromage de Cabrales semble donc négligeable.

Les leuconostocs sont moins sensibles que les streptocoques au chlorure de sodium. Le rapport « temps de génération avec 5 p. 100 NaCl/temps de génération avec 0 p. 100 NaCl » était en moyenne de 2,50 pour les souches de l'intérieur et de 3,65 pour celles de l'extérieur. Nous avons constaté pour 11 souches sur 12 une stimulation en présence de 1 p. 100 NaCl. *L. lactis* était la plus halosensible : le rapport mentionné était 4,19 pour une souche de l'intérieur et 5,80 en moyenne pour deux souches de l'extérieur, ce qui peut expliquer la faible proportion des souches isolées.

c) LES LACTOBACILLES

Dans le fromage de Cabrales la population de lactobacilles n'arrivait à son maximum, supérieur à $10^8/g$, qu'après 60 j d'affinage (Nunez, 1978) au lieu de 10 j pour le Roquefort (Devoyod, 1970), ce qui s'explique par les différentes dates de salage : 3^e à 4^e j pour le Cabrales et 10^e à 16^e j pour le Roquefort.

Lactobacillus plantarum était l'espèce la plus courante dans le fromage de Cabrales : elle représentait 82 p. 100 des souches de lactobacilles isolées à la surface et 97 p. 100 de celles isolées au centre du fromage, ce qui contredit les résultats de Burgos *et al.* (1971). Sharpe et Brindley (1956) ont montré que *L. plantarum* était également l'espèce dominante à la surface du fromage de Stilton et Devoyod (1970) a signalé cette espèce comme la plus fréquemment isolée dans le fromage de Roquefort.

Les six souches de *L. casei* subsp. *casei* étudiées, ainsi qu'une des deux souches de *L. casei* subsp. *rhamnosus*, ont été isolées à la surface du fromage après salage.

Le rapport « temps de génération avec 5 p. 100 NaCl/temps de génération avec 0 p. 100 NaCl » pour les lactobacilles était le plus bas des trois genres étudiés. Nous avons observé une stimulation pour 9 souches sur 12 en présence de 1 p. 100 NaCl, pour 8 souches sur 12 en présence de 2 p. 100 NaCl et pour 4 souches sur 12 en présence de 3 p. 100 NaCl.

La moyenne des temps de génération pour *L. plantarum* en présence de 5 p. 100 NaCl était seulement de 223 mn pour les souches

de la surface et de 187 mn pour les souches du centre du fromage. A cause de cette halotolérance et de sa capacité à se développer à bas pH, *L. plantarum* devenait l'espèce bactérienne dominante pendant et après le deuxième mois d'affinage dans le fromage de Cabrales.

En raison de leurs propriétés protéolytiques et lipolytiques, les lactobacilles sont susceptibles de participer à la maturation du fromage de Cabrales : au 60^e j, ils représentaient dans l'une des fabrications (A) 78 p.100 des germes totaux au centre du fromage et 29 p.100 dans l'autre (B) ; au 90^e j, ces proportions étaient de 85 p.100 pour la fabrication A et de 48 p.100 pour la fabrication B.

Résumé

Lors d'une étude sur deux fabrications traditionnelles de fromage bleu de Cabrales, 261 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait, du caillé et du fromage pendant la maturation et identifiées comme étant des streptocoques (85), des leuconostocs (59) et des lactobacilles (117).

Parmi les streptocoques, *Str. lactis* dominait pendant la fabrication et au cours de tout l'affinage ; la plupart des souches étudiées étaient halosensibles et faibles productrices d'acide lactique. La peu nombreuse population d'entérocoques appartenait surtout à l'espèce *Str. faecium*. L'espèce *Str. acidominimus* était présente à la surface du fromage affiné.

Leuconostoc dextranicum et *L. paramesenteroides* représentaient ensemble 76 p.100 des leuconostocs isolés. Moins sensibles au chlorure de sodium que les streptocoques et ne produisant pas du diacétyle, leur faible nombre leur empêche de jouer un rôle dans l'ouverture de la pâte.

L'espèce dominante de lactobacilles était *L. plantarum* : 92 p.100 des souches isolées. A cause de son halotolérance, elle constituait la presque totalité de la flore bactérienne pendant et après le deuxième mois d'affinage pouvant ainsi intervenir dans le mécanisme de la maturation du fromage de Cabrales.

Summary

Throughout a work on two batches of traditionally made Cabrales blue cheese, 261 lactic acid bacteria strains were isolated from milk, curd and cheeses at different stages of their ripening period and identified as follows : 85 streptococci, 59 leuconostocs and 117 lactobacilli.

Among streptococci, *Str. lactis* prevailed during cheese-making and the whole ripening period ; most of our strains showed a low

salt tolerance and were weak lactic acid producers. Enterococci, present at low levels, belonged mainly to the species *Str. faecium*. The species *Str. acidominimus* was present on the surface of ripened cheese.

Leuconostoc dextranicum and *L. paramesenteroides* comprised as a whole 76 p.100 of the isolated leuconostocs. Less affected by sodium chloride than streptococci and not producing diacetyl, low levels limit their contribution to the opening of the curd.

Accounting for 92 p.100 of the isolated lactobacilli strains, *Lactobacillus plantarum* was the dominant species. Due to its halotolerance *L. plantarum* became the majority bacterial flora from the second month of maturation, being probably involved in the process of Cabrales cheese ripening.

Reçu pour publication en juillet 1979.

Bibliographie

- BARRITT (M.M.) (1936). — The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J. Path. Bact.*, 42, 441.
- BUCHANAN (R. E.) and GIBBONS (N. E.) (1974). — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Waverley Press Inc., Baltimore.
- BURGOS (J.), LOPEZ (A.) i SALA-TREPAT (F. J.) (1971). — Maduración del queso « Cabrales ». Microflora : I. Lactobacilos. *Anales Fac. Vet. Leon*, 17, 109.
- CAVETT (J. J.) and GARVIE (E. I.) (1967). — Biochemical and serological characters of three strains of streptococci previously reported as *Streptococcus cremoris* isolated from deep-frozen peas after thawing. *J. appl. Bact.*, 30, 377.
- DE MAN (J. C.), ROGOSA (M.) and SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.*, 23, 130.
- DEVOYOD (J. J.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Le Lait*, 49, 637.
- DEVOYOD (J. J.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. V. Les lactobacilles. *Le Lait*, 50, 277.
- DEVOYOD (J. J.) et DESMAZEAUD (M.) (1970). — Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des leuconostoc. *Le Lait*, 50, 374.
- 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*, 49, 369.
- ELLIKER (P. R.), ANDERSON (A. W.) and HANNESSON (G.) (1956). — An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.*, 39, 1612.
- FRAZIER (W. C.) (1926). — A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. infect. Dis.*, 39, 302.
- GARVIE (E. I.) (1960). — The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27, 283.
- GARVIE (E. I.) (1967). — *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. gen. Microbiol.*, 48, 431.
- KENNER (B. A.), CLARK (H. F.) and KABLER (P. W.) (1961). — Faecal streptococci. I. Cultivation and enumeration of streptococci in surface waters. *Appl. Microbiol.*, 9, 15.

- NAYLOR (J.) and SHARPE (M. E.) (1958). — Lactobacilli in Cheddar cheese. I. The use of selective media for isolation and of serological typing for identification. *J. Dairy Res.*, 25, 92.
- NUNEZ (M.) (1976). — Flora microbiana del queso Manchego. V. *Leuconostoc*. *Anales INIA, Ser. General*, 4, 67.
- NUNEZ (M.) (1978). — Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *J. Dairy Res.*, 45, 501.
- ORVIN-MUNDT (J.) (1976). — Streptococci in dried and frozen foods. *J. Milk & Food Tech.*, 39, 413.
- REDDY (M. S.), VEDAMUTHU (E. R.) and REINBOLD (G. W.) (1971). — A differential broth for separating the lactic streptococci. *J. Milk & Food Tech.*, 34, 43.
- SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and HAYS (H.) (1962). — Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Can. J. Microbiol.*, 8, 161.
- SHARPE (M. E.) and BRINDLEY (M.) (1956). — Lactobacilli isolated from the surface of normal and slipcoat Stilton cheese. *J. Dairy Res.*, 23, 361.
- SHATTOCK (P. M.) and HIRSCH (A.) (1947). — Abstracts of Microbiological Methods. *J. Path. Bact.*, 59, 495. Ed. V. B. D. Skerman (1969). Wiley-Interscience, New York.
-