



HAL
open science

Etude d'un accident de fabrication du fromage de roquefort

Martine Forge, J. P. Guiraud, P. Galzy

► **To cite this version:**

┌ Martine Forge, J. P. Guiraud, P. Galzy. Etude d'un accident de fabrication du fromage de roquefort.
└ Le Lait, 1977, 57 (561_562), pp.24-36. hal-00928749

HAL Id: hal-00928749

<https://hal.science/hal-00928749>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Étude d'un accident de fabrication du fromage de roquefort

par

Martine FORGE, J. P. GUIRAUD et P. GALZY

*Laboratoire de Microbiologie, Sciences et Technologies Alimentaires
Université des Sciences et Techniques du Languedoc
34060 Montpellier (France)*

INTRODUCTION

Certains fromages de Roquefort sont parfois contaminés par un micro-organisme qui se développe dans les cavités habituellement tapissées par le mycélium du *Penicillium roqueforti* Thom. Cette contamination se situe dans les cavités du cœur du fromage, rarement dans celles de la périphérie. Sa présence semble inhiber la croissance du *Penicillium roqueforti* car elle donne des fromages où le « bleu » est moins important et est remplacé par une tache de couleur crème ou rosée (photo 1). La présence de cette contamination est visible au

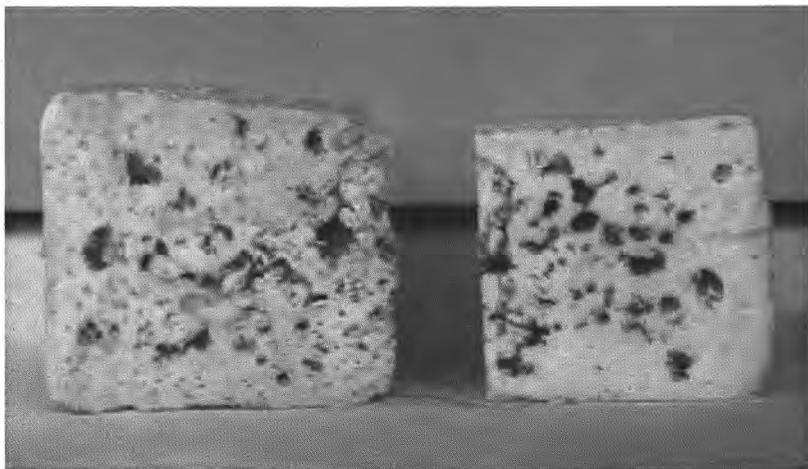


photo 1

Comparaison entre un fromage normal (à droite)
et un fromage contaminé (à gauche)

moment du plombage. La partie du fromage contaminée présente à la dégustation, un goût « de vieille croûte de Camembert desséchée ». Sa consistance caoutchouteuse indique une caséolyse différente de celle du *Penicillium roqueforti*.

Cette contamination ne se produit que de façon discontinue au cours de la « saison ». Sa fréquence d'apparition augmente avec la venue des températures estivales : faible en avril, elle s'intensifie pour atteindre son maximum en juin-juillet (fin de la saison laitière). Son origine n'a pas été approfondie. Lorsqu'elle apparaît, elle frappe environ 12 p. 100 des fromages d'un cuvier.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

Les prélèvements ont été effectués, à l'ose, sur une cavité contaminée du fromage et étalés en stries épuisantes à la surface d'un milieu Malt Agar acidifié en boîte de Pétri. Après 3 j de culture à 25° C, plusieurs sortes de colonies sont apparues : des colonies de type classique et de très nombreuses colonies de levures présentant un type mycélien correspondant au développement contaminant les cavités.

Nous avons repiqué plusieurs colonies de ce dernier type qui se sont révélées identiques du point de vue morphologique et avons poursuivi l'étude sur un clône issu de l'une d'elle : souche LR.

Au cours de l'étude taxonomique, nous avons utilisé une souche de *Trichosporon penicillatum* Do Carmo Sousa, CBS 5586, qui nous a permis de comparer les caractères de l'espèce type selon Lodder et ceux de notre souche. Il faut noter que cette souche est également admise par le CBS comme un *Geotrichum fragrans*. Cette souche provient de la collection du Centraalbureau voor Schimmelcultures (Pays-Bas).

Au cours de l'étude des conditions de culture, nous avons comparé la souche isolée LR avec une souche industrielle de *Penicillium roqueforti* Thom (PR). Cette souche nous a été fournie par la Société des Caves de Roquefort.

II. Techniques d'identification

Cette étude a été menée en utilisant les caractères taxonomiques préconisés par Lodder [1].

Nous avons approfondi certains tests biochimiques.

— *Lipolyse* : outre le test préconisé par Lodder, nous avons utilisé un milieu Gorodkowa-Agar contenant du Tween 80.

— Protéolyse

Nous avons étudié l'action de la souche LR sur l'albumine de l'œuf : un cube à arêtes vives est découpé dans le blanc d'un œuf dur et placé dans un milieu liquide constitué par :

Bacto Yeast Extract Difco (YE)	1 p. 100
Glucose	0,5 p. 100
Eau distillée q.s.p.	100 ml

stérilisé à 120° C, 20 mn.

La présence d'une protéolyse est décelée par une dissolution plus ou moins rapide du blanc d'œuf.

L'hydrolyse de caséine a été également étudiée selon deux méthodes :

— Ensemencement en touches sur gélose au lait coulée en boîtes de Pétri :

Gélose nutritive stérile	20 ml
Lait écrémé stérile	10 ml

Une zone de clarification apparaît autour des colonies des germes hydrolysant la caséine.

— Ensemencement du lait tournesolé :

Lait écrémé	10 ml
Teinture de tournesol pH 7,3 - 7,4	quelques gouttes

Autoclavé à 115° C, 30 mn.

Après incubation de 72 h à 25° C, on note l'ordre dans lequel apparaissent les phénomènes suivants :

— Acidification.	— Coagulation.
— Réduction.	— Peptonisation.

III. Techniques d'étude des conditions de développement

Le milieu de base étant celui décrit par Lodder (YE - peptone - eau), nous avons testés la croissance des deux micro-organismes en tubes de 10 ml de milieu, non agités, pour l'étude de l'influence de la température, en erlens de 100 ml remplis au 1/10 de leur volume et agités (A : 7 cm, 66 osc/mn), pour l'étude du rôle du pH.

Le pH est ajusté à des valeurs comprises entre 2 et 11 avec l'acide chlorhydrique ou de la soude.

La croissance en présence de chlorure de sodium a été effectuée en ajustant le milieu : bouillon glucosé à 2 p. 100 à des concentrations en chlorure de sodium allant de 0 à 20 p. 100. Le milieu de base est réparti en tubes non agités.

L'influence de la pression osmotique a été étudiée par ensemencement en stries de tubes de milieu gélosé additionné de glucose à

diverses concentrations élevées. Le glucose est mélangé à 10 ml de milieu suivant :

Yeast Extract Difco (YE)	1 p. 100
Agar	3 p. 100
Eau distillée q.s.p.	100 ml

Stérilisé 15 mn à 10 lbs.

VI. Techniques analytiques

— Détermination de la matière sèche du mycélium récolté :

Le développement des micro-organismes s'effectue à 25° C pendant 72 h. Après ce temps d'incubation, chaque culture est filtrée sur filtre sans cendres Durieux n° 111 (90 mm), préalablement taré, puis mis à l'étuve à 105° C pendant 24 h.

— Détermination de la matière sèche d'un fromage.

Des échantillons d'environ 10 g de fromage broyé manuellement sont placés dans des coupelles tarées, pesés puis mis 24 h à l'étuve à 105° C jusqu'à poids constant.

— Dosage du sodium dans le fromage :

Cette détermination est effectuée par potentiométrie, en employant l'électrode spécifique du sodium.

Le chlorure de sodium est solubilisé par quatre lavages successifs, à l'eau distillée très chaude, d'une quantité connue de fromage desséché. Le fromage et l'eau de lavage sont séparés au travers d'un verre fritté n° 4.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Identification

1.1. Aspect sur milieu solide

La culture est légèrement duveteuse, de couleur blanc mate.

1.2. Aspect sur milieu liquide (YE - peptone)

La souche LR se développe en formant un voile abondant et un léger culot. Après 1 mois le voile tombe au fond du tube.

1.3. Forme des cellules (photo 2)

Sur milieu solide ou liquide (YE - peptone) on observe des cellules ovales de taille $5,8 \mu \times 11,6 \mu$, présentant parfois un bourgeonnement multipolaire pouvant être confondu avec la germination d'un mycélium. On observe aussi des chaînes d'arthrospores de forme rectangulaire ($5,8 \mu \times 20 \mu$) mais à angles arrondis et des fragments de mycélium cloisonné.

Sur milieu agité le mycélium est rare et les cellules présentent un bourgeonnement abondant et anarchique, qui, souvent, évolue vers la formation d'un fragment mycélien : il y a peu d'arthrospores.

1.4. *La culture sur lame* permet de mettre en évidence un vrai mycélium présentant des ramifications portant des chaînes d'arthrospores (photo 3). Il n'y a pas de blastospores.

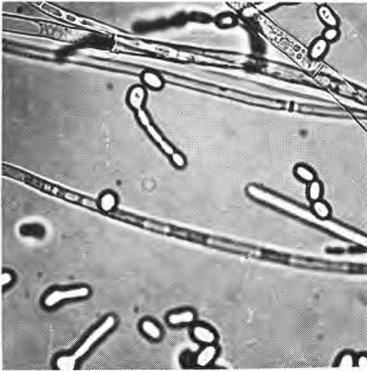


photo 2

Aspect de la souche L.R. sur milieu liquide YE-Peptide.

(Grossissement $\times 180$).

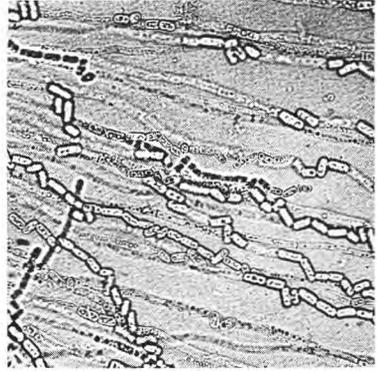


photo 3

Aspect de la souche L.R. sur milieu de filamentation.

(Grossissement $\times 180$).

1.5. *Formation de spores*

Les milieux testés n'ont pas permis la mise en évidence de spores, ce qui suggère que la souche isolée est un *Fungi imperfecti*. Sur les milieux de sporulation le mycélium est rare ainsi que les bourgeonnements. Les cellules sont ovales à rectangulaires.

1.6. *Caractères biochimiques*

— Fermentation du glucose.

— Assimilation.

Glucose	+	D ribose	—
Galactose	+	L rhamnose	—
L. sorbose	+	Ethanol très faible	
Sucrose	—	Glycérol	+
Maltose	+	Erythritol	—
Cellobiose	—	Ribitol	—
Trehalose	—	Galactitol	—

Lactose	—	D mannitol	+
Mélibiose	—	D glucitol	+
Raffinose	—	acétyl-D glucoside	—
Mélézitose	—	Salicine	—
Inuline	—	Acide DL lactique	+
Amidon soluble	—	Acide succinique	+
D xylose	+	Acide citrique	—
L arabinose	—	Inositol	—
D arabinose	—		
		Nitrate de potassium	—
		Nitrite de potassium	—
		Urée	—

Croissance sur milieu sans vitamine : +.

— Tests technologiques

a) Protéolyse :

Liquéfaction de la gélatine	—
Action sur l'albumine de l'œuf	—
Gélose au lait	—
Lait tournesolé	aucune action

b) Lipolyse :

Végétaline	—	Tween 80	—
------------	---	----------	---

La souche étudiée est très proche par ses caractères taxonomiques de l'espèce de levure *Trichosporon penicillatum* Do Carmo Sousa. Cependant elle en diffère par l'absence totale de fermentation du glucose par l'assimilation positive du maltose et du D mannitol. D'autre part, la taille des cellules de la souche LR est supérieure à celle d'une souche témoin de *Trichosporon penicillatum* CBS 5586 ($2,5 \mu \times 8 \mu$).

Il faut noter que la présence de bourgeonnement et, par conséquent, de véritable forme levure en milieu liquide est bien loin d'être nette aussi bien avec notre souche qu'avec la souche CBS 5586. Certes de nombreuses cellules bourgeonnantes sont visibles ; mais certaines d'entre elles correspondent certainement à la germination d'un nouveau mycélium. Les souches de *Trichosporon* sont donc très voisines des *Geotrichum* et ont, d'ailleurs, été souvent décrites sous le nom de *Geotrichum*.

II. Etude des conditions de développement

Afin de mieux comprendre le mécanisme de la contamination nous avons étudié les conditions de développement de la souche LR en la comparant avec une souche industrielle de *Penicillium roqueforti*: PR.

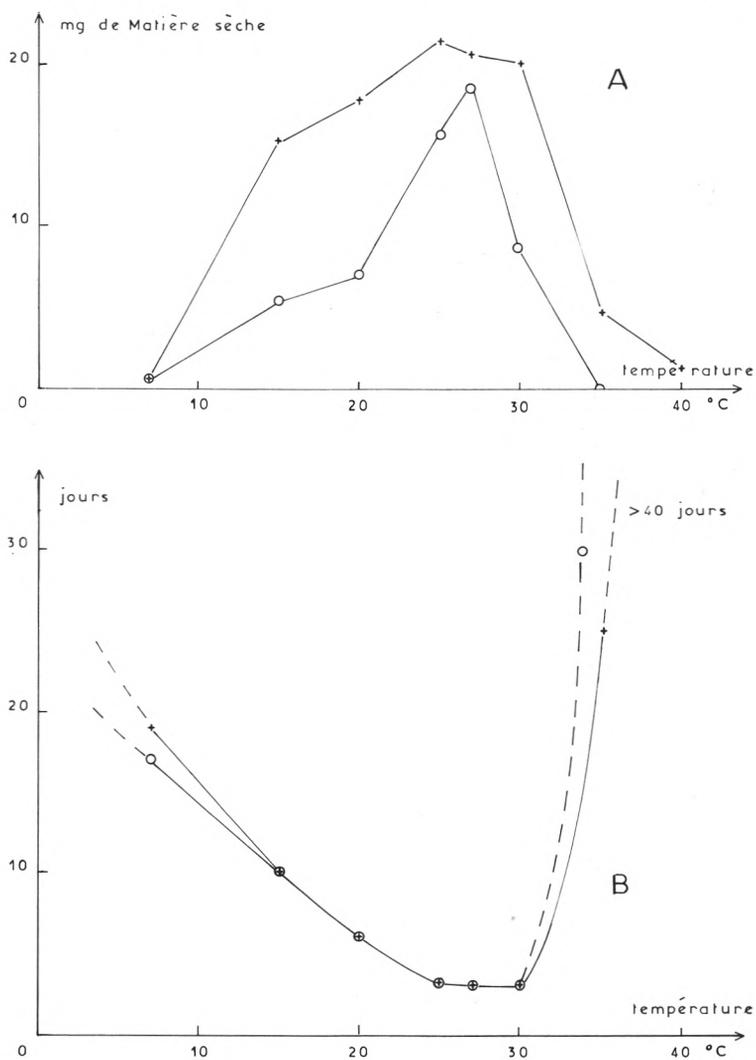


fig. 1

Action de la température sur la croissance des souches LR et PR

A : Croissance en fonction de la température.

B : Temps nécessaire à l'obtention d'une croissance optimum à différentes températures.

LR +
PR ○ (moyenne de trois expériences)

1) *Rôle de la température*

Les figures 1 A et B montrent que les souches LR et PR se comportent de façon à peu près analogue lorsque la température de culture varie. Elles présentent un développement optimum vers 25° C - 27° C. La souche LR se comporte cependant mieux à 40° C que *Penicillium roqueforti* Thom.

2) *Rôle du pH* (fig. 2)

La souche LR est légèrement moins acidophile que PR bien que les deux souches aient des comportements très voisins vis-à-vis du

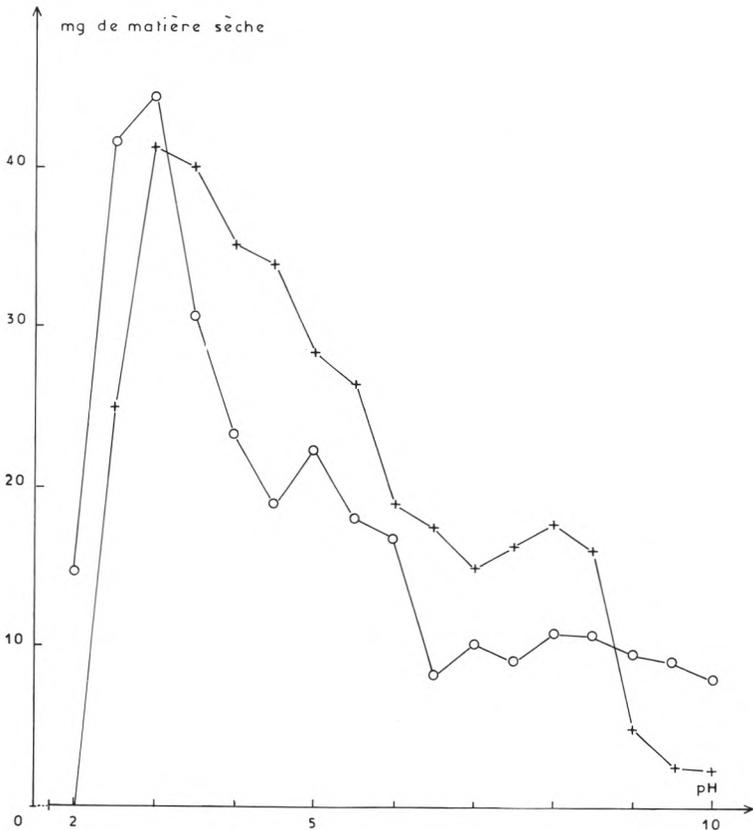


fig. 2

Action du pH sur la croissance des souches LR et PR

LR +

PR o (moyenne de deux expériences)

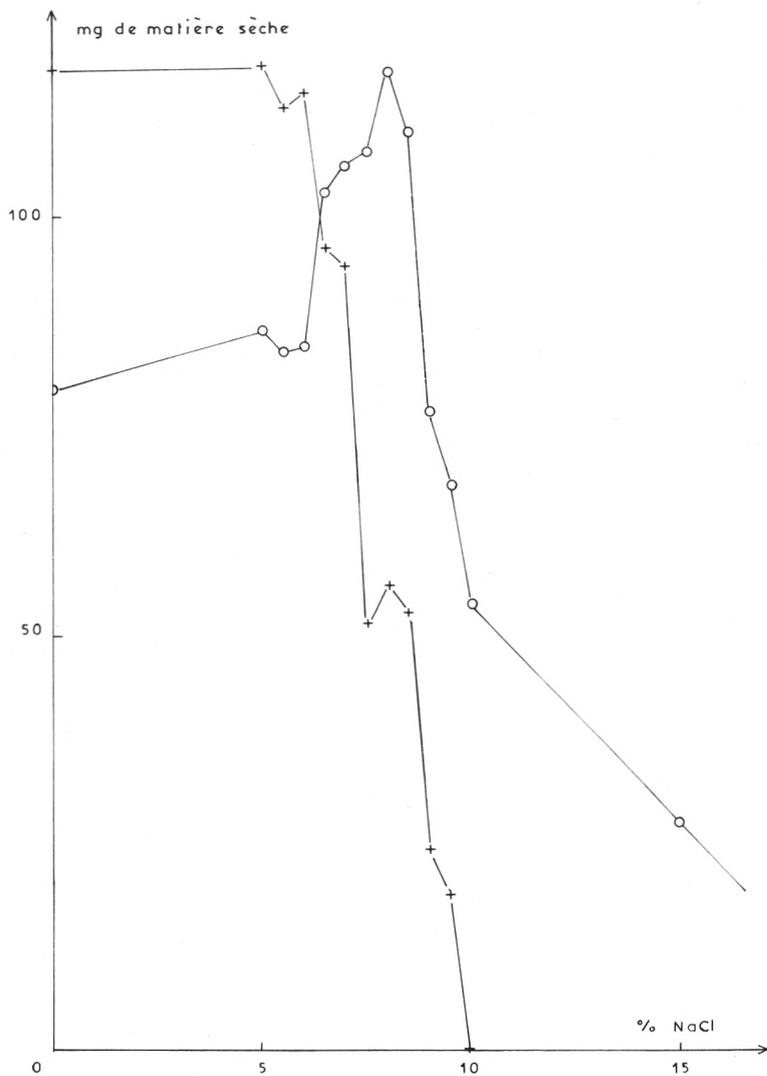


fig. 3

Action de la concentration en NaCl sur la croissance des souches
LR et PR

LR +
PR o (moyenne de six expériences)

pH. Lorsque le pH s'élève au-dessus de 8, la croissance est très limitée pour les deux souches. La croissance optimale des deux micro-organismes se situe au même pH 3.

Il faut cependant noter que dans tous les cas le pH en fin de culture est voisin de 8. En effet il n'a pas été possible d'effectuer l'expérience en milieu tamponné car les tampons sont inefficaces. Certains (phthalate, acétate) sont inhibiteurs, d'autres (phosphates, lactate, succinate...) sont métabolisés. De ce fait, les résultats obtenus entre pH 4 et 8 ne sont pas très précis.

3) Rôle de la pression osmotique

Les résultats résumés dans le tableau 1 montrent que la croissance de la souche LR est limitée beaucoup plus rapidement par la pression osmotique que celle de la souche PR.

4) Rôle du chlorure de sodium

Les résultats de cette expérience (fig. 3) sont très intéressants du fait de la différence de comportement de ces deux souches vis-à-vis du chlorure de sodium.

La souche LR semble beaucoup plus sensible au sel que PR. Le développement optimum de LR se situe entre des concentrations de 0 p.100 et 5 p.100 en chlorure de sodium. *Penicillium roqueforti* a une croissance plus abondante à des taux de sel compris entre 5 p.100 et 8,5 p.100 qu'en absence de NaCl. La concentration limite en NaCl est de 10 p.100 pour la souche LR. Au bout de 3 jours à 25° C, la croissance de LR est nulle alors que celle de *Penicillium roqueforti* est encore notable. La concentration limite en NaCl de PR

TABLEAU 1

Croissance en fonction de la pression osmotique (milieu hyperglucosé)

Micro-organismes	Glucose en p. 100				
		50 p. 100	60 p. 100	70 p. 100	80 p. 100
LR		+	0	0	0
PR		+++	++	+	faible

TABLEAU 2

Teneur en matière sèche (MS) et NaCl dans deux fromages
en fonction de la zone de prélèvement

Echantillon	Fromage normal		Fromage contaminé	
	MS en p. 100	NaCl en p. 100	MS en p. 100	NaCl en p. 100
1	58,9	4,77	55,2*	4,21
2	59,2	5,79	54,9	4,22
3	59,8	4,87	53,5	3,96

* Remarque : cet échantillon n'était apparemment pas contaminé.

est nettement plus élevée car une culture sur milieu 20 p. 100 donne un léger trouble au bout de 6 jours d'incubation à 25° C.

5) Discussion des tests technologiques

Dans la majorité des fromages, la souche *Penicillium roqueforti* Thom occupe normalement le milieu. Lorsque les accidents de fabrication surviennent, la souche LR s'implante à la place de *Penicillium roqueforti*. Ceci peut s'expliquer par deux causes :

— Une contamination accrue du lait par la souche LR. Le fait que la contamination s'observe dans certains cas plus fréquemment en été où la flore du lait est plus abondante et est capable de se développer plus rapidement, montre que cet aspect doit intervenir au moins partiellement. Il faut rappeler que le Roquefort est fabriqué avec du lait cru.

— Une variation des conditions de développement des champignons au sein des divers fromages. Nos expériences indiquent que l'apparition du contaminant LR peut être lié à une baisse de la concentration en sel ou de la pression osmotique. Les accidents se produisent à la saison chaude, en fin de la période de lactation. A ce stade, plusieurs facteurs peuvent modifier le salage. Les fortes chaleurs favorisent la prolifération des germes du lait, une acidification très forte, et de ce fait, l'obtention de fromages de faible porosité où le sel diffuse difficilement. En fin de lactation, il est observé, généralement, une élévation de la matière sèche et de la

teneur en matière grasse du fromage ; or, il est connu que le sel diffuse plus mal dans les fromages riches en matière grasse. Une exsudation peut également se produire pendant le salage et gêner ainsi la pénétration du sel. Par contre, les facteurs liés à la fin de la campagne semblent plutôt favorables à l'obtention de fromages riches en matière sèche : forte teneur du lait en matière sèche, égouttage rapide lié à une forte acidification.

On peut donc penser qu'en été il se produit dans certains fromages un trouble de la diffusion du sel ce qui entraîne une concentration en chlorure de sodium trop faible au cœur du fromage. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons déterminé les teneurs en matière sèche et en chlorure de sodium de deux fromages : l'un de très bonne qualité, l'autre contaminé par *Trichosporon penicillatum*. Nous avons effectué sur chaque fromage trois prélèvements situés :

- Le premier au bord du talon.
- Le deuxième à égale distance entre cœur et talon.
- Le troisième au cœur.

D'après le tableau 2, on peut remarquer que le fromage contaminé présente des taux de matière sèche et de chlorure de sodium nettement inférieurs à ceux rencontrés dans le fromage normal. Il semble bien exister une relation entre la présence de la contamination d'une part, le taux de NaCl et la pression osmotique, d'autre part. Il est curieux que le fromage contaminé ait une faible teneur en matière sèche malgré la saison.

Tous nos résultats montrent que la contamination serait vraisemblablement évitée si le salage ou plutôt la diffusion du sel était satisfaisante.

CONCLUSION

Le contaminant isolé correspond, par ses caractères taxonomiques à l'espèce *Trichosporon penicillatum* Do Carmo Sousa.

Le développement de ce micro-organisme, à la place du *Penicillium roqueforti* Thom, est dû essentiellement à une variation de la pression osmotique et de la concentration en NaCl au sein du fromage.

Résumé

Un accident dans le fromage de Roquefort est dû au développement de *Trichosporon penicillatum* Do Carmo Sousa.

Cet accident se produit lorsque la teneur en chlorure de sodium du fromage est anormalement faible.

Summary

A making flaw in Roquefort cheese comes from growth of *Trichosporon penicillatum* Do Carmo Sousa.

This flaw occurs when salt concentration is anormaly weak.

Reçu pour publication en septembre 1976.

Bibliographie

- [1] LODDER (J.) (1970). — The Yeast. A taxonomic study. North Holland Publishing Company, Amsterdam-London.

Remerciements

Nous remercions le Laboratoire de la Société des Caves de Roquefort pour les informations qu'il nous a donné.
