

QUELLES SONT LES ÉVOLUTIONS DE LA FLORE MICROBIENNE DANS LES LAITS ET LES FROMAGES

1) CONTEXTE

Tout ou partie de la microflore jouant un rôle important dans la qualité des fromages au lait cru, en particulier sur le plan gustatif, est apportée par le lait cru. Cette microflore est appelée microflore naturelle (ou indigène) du lait. Elle permet de préserver la typicité et une certaine diversité et richesse sensorielle des fromages.

La microflore naturelle du lait cru est très diversifiée. Selon son intérêt et ses conséquences en fromagerie, on peut la scinder en 4 groupes :

- Les microflores utiles ou technologiques : microflores de la pâte (lactocoques, de nombreux lactobacilles, leuconostocs), microflores de surface (levures, moisissures, microcoques, etc.) ;
- Les microflores indésirables : certains coliformes et *Pseudomonas*, *Clostridium*, certains lactobacilles
- Les microflores potentiellement pathogènes : *E. coli*, staphylocoques à coagulase positive, salmonelles, *Listeria monocytogenes*.
- Les microflores dont le rôle est incertain et/ou mal connu : Entérocoques, ...

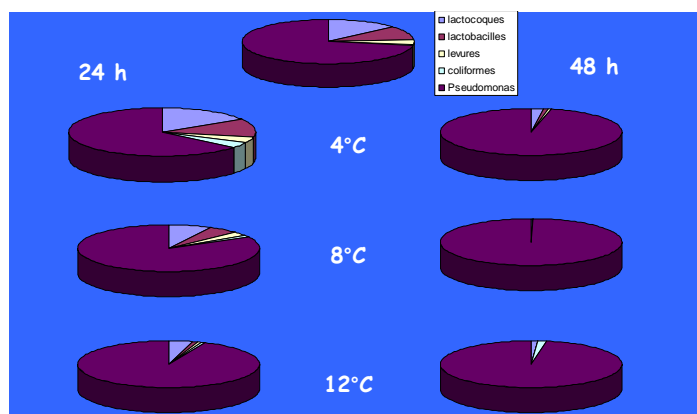
Les équilibres microbiens dans le lait en fin de traite sont la conséquence des pratiques en amont : méthodes d'élevage, méthodes de traite et méthode de nettoyage du matériel en contact avec le lait.

Dans cette fiche, sont présentées les évolutions des microflores microbiennes d'une part dans le lait cru au cours de son report, d'autre part, dans plusieurs variétés de fromages fabriqués à partir de lait cru.

2) ÉVOLUTION DE LA MICROFLORE NATURELLE PENDANT LA CONSERVATION DU LAIT CRU

Les recherches réalisées à l'Université de Caen Basse-Normandie démontrent l'impact du couple température/temps de conservation sur la microflore naturelle du lait de vache.

La figure ci-contre montre l'évolution des proportions de différentes microflores au cours du report de 12 échantillons de lait selon plusieurs conditions de température et de durée.



La température et la durée de report du lait modifient les niveaux microbiens originels. Ainsi :

- Si le lait est conservé à 4°C pendant 24h, il n'existe pas d'évolution significative de microflore. Par contre, après 48 h à 4°C, le niveau des *Pseudomonas* augmente.
- Si le lait est conservé à 8°C pendant 24h, il n'y a pas d'évolution significative de microflore. Après 48h à 8°C, on observe une augmentation du niveau de deux microflore utiles (lactocoques, levures) mais également de deux microflore potentiellement indésirables (coliformes et *Pseudomonas*).
- Si le lait est conservé à 12°C pendant 24h, le niveau d'une microflore utile (lactocoques) ainsi que de deux microflore potentiellement indésirables (coliformes et *Pseudomonas*) augmente. A 12°C pendant 48h, on constate en plus une augmentation du niveau de deux microflore utiles (lactobacilles, levures).
- Dans tous les cas, autres que la conservation à 4°C pendant 24 h, le niveau des *Pseudomonas* augmente de façon plus importante que celui des autres microflore. Ce groupe microbien devient ainsi dominant, proportionnellement aux autres.

Contacts : Nathalie Desmasures ; Université de Caen Basse-Normandie;
nathalie.desmasures@unicaen.fr

3) ÉVOLUTION DE LA MICROFLORE NATURELLE DU LAIT DANS LES FROMAGES AU LAIT CRU

Des études concernant plusieurs fromages décrivent le comportement d'une partie des microflore bactériennes naturelle du lait cru pendant l'affinage de ces fromages.

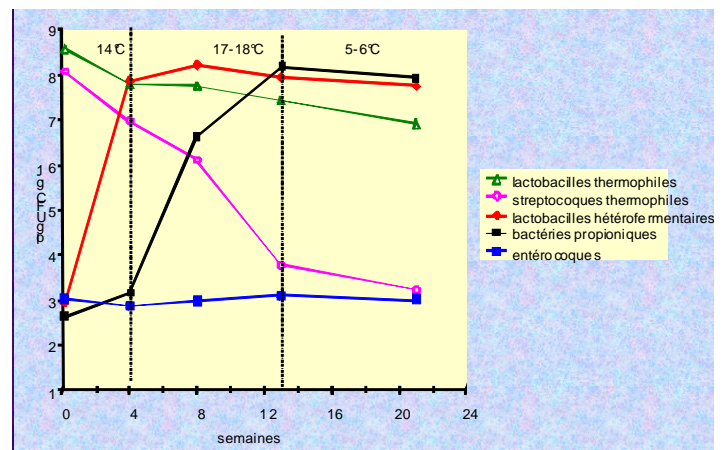
EN COMTE :

Le schéma ci-contre illustre les évolutions moyennes, pendant l'affinage, des nombres mesurés dans la pâte pour les 4 microflore majeures et pour une microflore mineure (Données issues de 20 meules fabriquées dans 5 fruitières).

Au cours de l'affinage, la succession des 4 microflore majeures est similaire dans tous les fromages. Par contre des différences pouvant aller jusqu'à un facteur 100 peuvent exister pour les niveaux d'une population entre fromages issus de fruitières différentes.

Dans la pâte,

- une grande partie de la microflore naturelle du lait reste toujours sous-dominante, voir ne se développe pas. Il s'agit des *Pseudomonas*, coliformes, microcoques/staphylocoques, entérocoques, leuconostocs, lactocoques et levures.
- à l'opposé, les souches de trois espèces bactériennes dominantes pendant l'affinage, les deux lactobacilles mésophiles *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus rhamnosus* et la bactérie propionique *Propionibacterium freudenreichii*, sont toujours issues de la microflore naturelle du lait utilisé pour la fabrication.



- Certaines des souches des trois espèces de streptocoques et lactobacilles thermophiles dominantes avant l'affinage et au début de l'affinage, apportées par les levains, peuvent être issues de la microflore naturelle de laits (précédemment) utilisés pour la fabrication.

Dans la pâte, les deux microflores lactiques acidifiantes, streptocoques et lactobacilles thermophiles, sont largement majoritaires en début d'affinage à cause de leur croissance préalable et deviennent non cultivables dès les premières semaines d'affinage. Les souches qui dominent peuvent être à la fois des souches ajoutées intentionnellement ou non. Du fait des modes de préparation des levains, les dernières sont sans doute sélectionnées à partir des souches de la microflore naturelle des laits crus ayant servi aux fabrications précédentes.

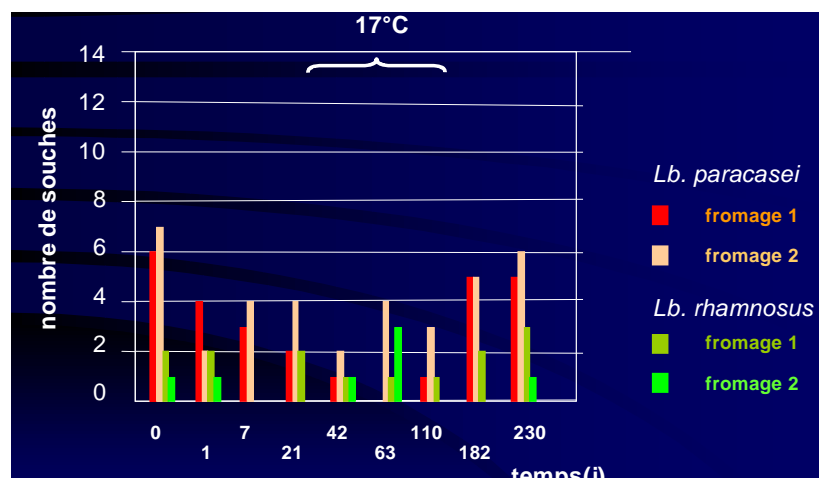
Dans la pâte, deux microflores utiles naturelles du lait de cuve, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et les bactéries propioniques, se retrouvent en début d'affinage à des niveaux proches de ceux mesurés dans le lait et se développent pendant l'affinage pour devenir les deux microflores cultivables majoritaires au cours de l'affinage. Au contraire, une autre microflore naturelle, les entérocoques, reste à un niveau faible pendant toute la durée de l'affinage.

Parmi toutes les espèces, ainsi que parmi les souches d'une même espèce, de la microflore naturelle d'un lait de cuve, ce ne sont pas forcément les plus abondantes qui deviennent dominantes dans le fromage issu de ce lait. Ce sont sans doute les espèces et les souches les mieux adaptées aux conditions prévalant dans la pâte de ce fromage.

Ainsi, au sein des lactobacilles/pédiocoques mésophiles et des bactéries propioniques, seule une espèce parmi celles initialement présentes naturellement dans le lait devient dominante pendant l'affinage.

- au sein des lactobacilles/pédiocoques mésophiles, c'est une espèce de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, *L. para(casei)*, ou *L. rhamnosus* si présente en même temps que *L. paracasei*, qui prend nettement le dessus sur toutes les espèces de lactobacilles hétérofermentaires stricts et les autres espèces de lactobacilles/pédiocoques hétérofermentaires facultatifs comme *L. plantarum*, *P. pentosaceus* et *P. acidilactici*.
- au sein des bactéries propioniques, c'est l'espèce *P. freudenreichii* qui prend nettement le dessus sur les espèces *P. thoeni* et *P. jensenii*.

De même, à l'intérieur de chacune de ces espèces, seules une ou deux souches parmi la petite dizaine pouvant être initialement présentes dans le lait prennent nettement le dessus.



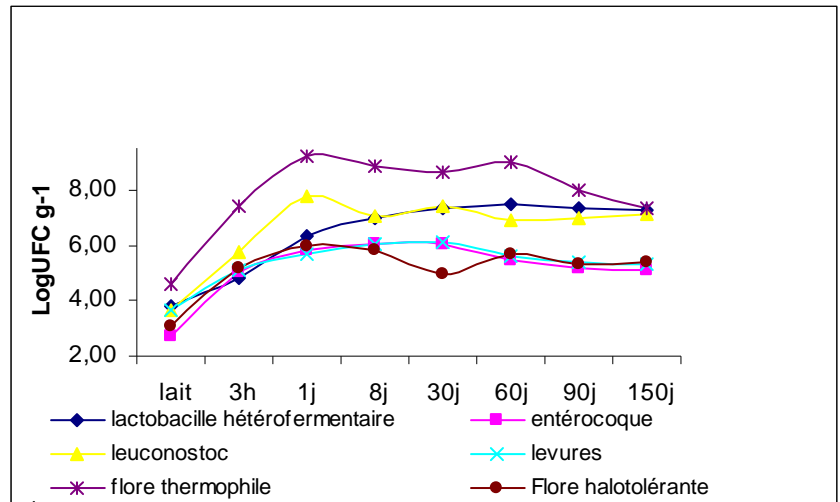
Évolution du nombre de souches de 2 espèces de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs dans 2 Comtés d'origine différente au cours de l'affinage

Contacts : Yvette Bouton ; CIGC Poligny ; y.bouton@comte.com et Françoise Berthier; INRA-UR342 Technologie et Analyses Laitières Poligny; francoise.berthier@poligny.inra.fr

EN SALERS :

La dynamique des populations caractérisant le fromage d'AOC Salers est présentée dans la figure ci contre. Elle est marquée par l'importance quantitative des populations de levures, de *Leuconostoc*, de flores thermophiles et de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs dont la croissance se poursuit pendant toute la durée de l'affinage. La traite dans une « gerle » de bois enrichirait le lait en ces micro-organismes d'intérêt technologique car leur niveau est important dès le lait en absence d'ensemencement exogène. Ces populations sont composées d'une grande diversité d'espèces bactériennes ou de levures.

Par exemple, des souches de levures appartenant aux espèces *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides* et *Debaryomyces hansenii* ont été systématiquement inventoriées dans les 3 productions étudiées alors que certaines souches appartenant aux espèces *Candida parapsilosis*, *Candida silvae*, *Candida intermedia*, *Candida rugosa*, *Saccharomyces unisporus*, et *Pichia guilliermondii* ne sont isolées que dans certaines productions.

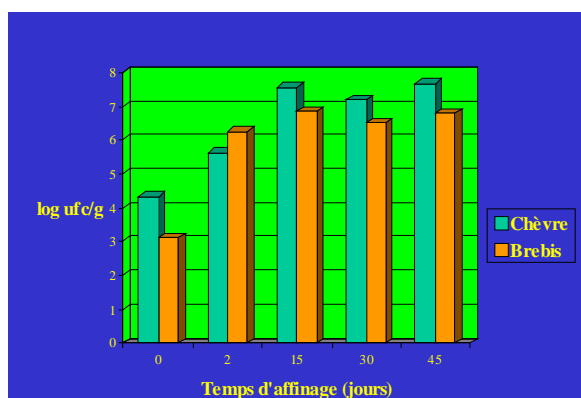


Évolution des populations microbiennes d'intérêt technologique dans le fromage Salers

Contacts : Marie Christine Montel ; INRA Aurillac ; marie-christine.montel@clermont.inra.fr

EN VENACO

L'étude de la microflore du Venaco, pâte molle à croûte lavée de Corse fabriquée à partir de lait cru de chèvre ou de brebis, a été réalisée à l'Inra de Corte. Les dénombrements portant sur des fromages fabriqués sans ajout de ferments, les flores dénombrées proviennent exclusivement de la microflore naturelle.



Évolution de la population de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs au cours de l'affinage du Venaco

Les lactocoques, présents dans les laits à hauteur de 10^5 germes/mL se développent rapidement pour atteindre environ 10^9 germes/g après 2 jours. Ce genre représente le principal agent acidifiant du Venaco. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont 10 fois plus nombreux dans les laits de chèvre (2×10^4) que dans ceux de brebis (10^3). De par leur équipement en protéases, ces bactéries vont être actives pendant l'affinage en s'attaquant aux caséines.

La population d'entérocoques est environ 30 fois plus élevée dans le lait de brebis (environ 5×10^4) que dans le lait de chèvre (1.7×10^3). Ces bactéries vont agir pendant l'affinage. Leurs enzymes protéolytiques vont hydrolyser les caséines et leurs lipases vont transformer la matière grasse.

Concernant la flore non lactique, les levures-moisissures sont plus nombreuses dans le lait de chèvre. Étant des germes acidophiles, leur croissance est permise par l'acidification de la pâte dans les premiers jours qui suivent le caillage. En consommant l'acide lactique, ces germes de surface vont désacidifier la pâte. Elles participent également à la protéolyse et à la lipolyse.

Les bactéries halotolérantes (microcoques, bactéries corynéformes) sont présentes dans les laits (3×10^3 germes/mL). Elles vont se développer en surface pendant l'affinage, grâce notamment à la désacidification de la pâte et aux soins de croûte prodigués par le fromager. La composition et l'action de la microflore sont schématisées sur le tableau ci dessous :

Composition	Action enzymatique	Effet sur les plans technologique et sensoriel
Lactocoques	Acidification	Protection acide, égouttage
Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	Protéolyse	Consistance, goût
Leuconostocs	Fermentation du citrate, production de CO ₂	Goût, ouvertures
Entérocoques	Protéolyse et lipolyse	Consistance, goût, odeur
Levures-moisissures (surface)	Désacidification de la pâte, Protéolyse et lipolyse	Consistance, goût, odeur
Bactéries halotolérantes (surface)	Protéolyse et lipolyse	Coloration de la croûte, goût, odeur

Ces résultats montrent la diversité de la flore naturelle du Venaco et son rôle dans l'élaboration des caractéristiques du fromage.

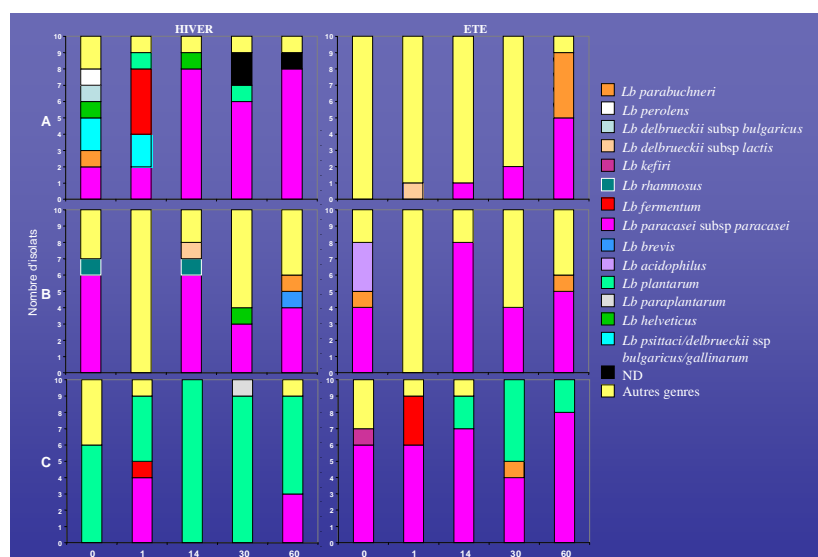
L'écosystème microbien d'un fromage au lait cru est donc complexe. Chaque composante a une fonction majeure dans l'élaboration du fromage. De plus, de nombreuses interactions existent entre ces composantes microbiennes comme par exemple l'installation des levures moisissures permise par l'acidification produite par les lactocoques.

Contacts : Érick Casalta ; INRA Corte ; Erick.Casalta@corte.inra.fr

EN CAMEMBERT DE NORMANDIE

La diversité et la dynamique des populations lactobacilles au cours de la transformation fromagère du lait cru en camembert AOC ont été étudiées dans trois ateliers et à deux saisons distinctes. Quatorze espèces de lactobacilles ont été identifiées au cours de l'affinage du Camembert.

L'espèce majoritaire était *Lactobacillus paracasei*, pour laquelle une diversité importante au niveau souche (21 profils différents) et variable en fonction de la fromagerie a été mise en évidence. La seconde espèce la plus représentée parmi l'ensemble des isolats était *Lb. plantarum*, mais cette espèce était presque exclusivement issue d'une seule fromagerie. Parmi les autres espèces figuraient notamment *Lb. parabuchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*.



Diversité et dynamiques des lactobacilles cultivables au cours de la fabrication de Camembert de Normandie dans trois ateliers à deux périodes.

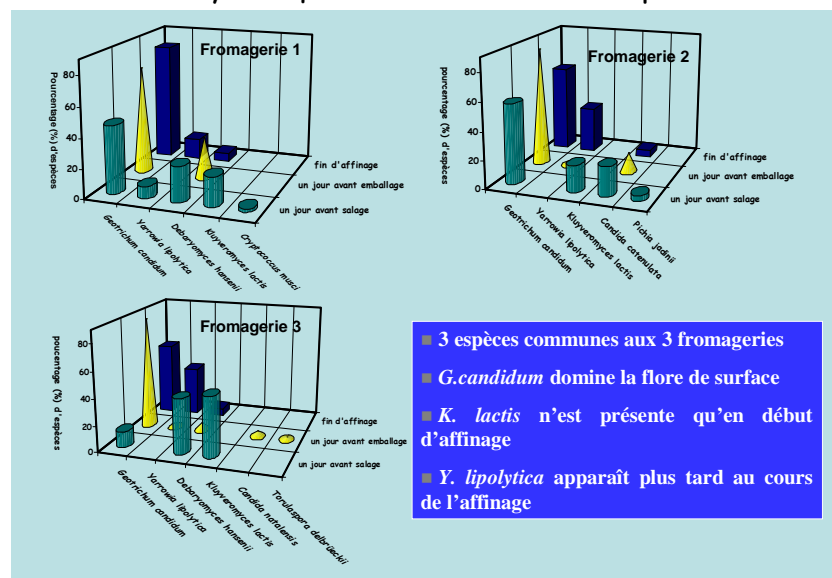
Bien que les lactobacilles soient rarement utilisés comme levains en fabrication de Camembert de Normandie, cette étude a montré leur présence quasiment constante dans les fromages étudiés et donné une image de la diversité et de la dynamique spécifique à chaque fromage.

A LA SURFACE DU LIVAROT

Une fabrication de Livarot a été suivie dans trois ateliers (prélèvements en début, milieu et fin d'affinage). Les levures dominantes ont été identifiées comme *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Pichia jadinii*, *Candida catenulata*, *Candida natalensis*, *Cryptococcus musci*.

L'étude des dynamiques montre que *Kluyveromyces* sp. intervient en début d'affinage. *Geotrichum candidum* et *D. hansenii* jouent un rôle tout au long de l'affinage et peuvent aussi bien participer à la désacidification du caillé qu'à la production de composés aromatiques. *Y. lipolytica* apparaît être essentielle dans l'équilibre de l'écosystème du Livarot ; son activité semble se mettre en place principalement à partir de la seconde moitié de l'affinage. Elle consisterait en la production de composés aromatiques par protéolyse secondaire et lipolyse. *Yarrowia lipolytica* jouerait un rôle indirect dans la couleur et l'apparence du fromage soit en limitant le développement du mycélium de *G. candidum*, soit en améliorant la production de pigments par les bactéries de surface.

Livarot : dynamiques la flore de levures par atelier



Dynamique de la flore levurienne à la surface de Livarots issus de 3 fromageries

Contacts : Nathalie Desmasures ; Université de Caen Basse-Normandie; nathalie.desmasures@unicaen.fr

Références bibliographiques :

- Depouilly A. , Dufrene F., Beuvier E., Berthier F. 2004. Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese, Lait, 84, 155-167.
- Callon C., Millet L., Montel M.C. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. Journal of Dairy Research 71, 231-244.
- Casalta E. 2003. Bases scientifiques de la qualité du Venaco, fromage traditionnel au lait cru. Mise au point de ferments sélectionnés spécifiques. Thèse, Université de Bourgogne.

- Desmasures N. 1995. Etude de laits de haute qualité : caractéristiques et aptitude microbiologique à la transformation en camembert au lait cru. Thèse, Université de Caen.
- Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. 2008. Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. Canadian Journal of Microbiology, 54, 218-228.
- Gente S, Larpin S, Cholet O, Guéguen M, Vernoux J-P, Desmasures N. 2007. Development of primers for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. Journal of Dairy Research, 74, 137-145.
- Grappin R., Beuvier E., Bouton Y., Pochet S. 1999. Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses. *Lait*, 79, 3-22.
- Larpin S, Mondolini C, Goerges S, Vernoux J-P, Guéguen M, Desmasures N. 2006. *Geotrichum candidum* dominates yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. 2006. FEMS Yeast Research, 6, 1243-1253.

<p>Auteur principal : BÉRODIER Antoine -CTFC 39800 POLIGNY 03.84.37.13.18 ab-ctfc@orange.fr</p> <p>Ont participé à cette fiche : - CASALTA Éric – INRA CORTE - MONTEL M. Christine – INRA Aurillac - MICHEL Valérie – GIS AJ - BOUTON Yvette - CIGC - DESMASURES Nathalie – Univ. Caen Basse-Normandie - BERTHIER Françoise - INRA Poligny</p>	<p>Crée le : 01/06/05</p>	<p>Modifiée le : 26/11/09</p>
---	--------------------------------------	--

Pour en savoir plus :

Antoine Bérodiér : (CTFC) : ab-ctfc@orange.fr

RMT filières fromagères valorisant leur terroir



Appelé "Réseau fromages de terroirs", il a pour vocation de répondre aux sollicitations de filières organisées valorisant les ressources de leurs terroirs (AOP, IGP, fermiers...). Ce RMT regroupe une dizaine de partenaires professionnels, technique, de la recherche et de la formation.

Ces actions concernent les caractéristiques des fromages, la durabilité des filières, la diversité sensorielle et le marché.

Des ouvrages et fiches de synthèse, des outils ou encore des journées de formation/information seront proposées aux filières valorisant leurs terroirs.

Le RMT est co animé par le CNAOL et le Suaci Alpes du Nord.