



FROMAGES FERMIERS LACTIQUES

Les micro-organismes intervenant dans l'affinage des fromages à pâte lactique



Source : D. Hardy, La Chèvre

Cette fiche concerne la microbiologie des fromages lactiques fermiers. Elle présente un état des connaissances sur les micro-organismes impliqués dans l'affinage et de leurs conditions de développement. Une deuxième partie précise d'où proviennent ces micro-organismes et comment ils peuvent être utilisés à l'état naturel ou sous forme de ferments du commerce pour la production de fromages lactiques fermiers affinés. En préalable de la lecture de cette fiche il est conseillé au lecteur de lire la fiche concernant « L'affinage : généralités ».

NB : Ne sont abordés dans cette fiche que les micro-organismes pour lesquels des références bibliographiques concernant leur impact dans l'affinage des fromages lactiques existent. Certaines flores dont les rôles sont encore peu, voire pas connus, ne sont pas abordées ici (*Arthrobacter*, *Pseudomonas*...). Cette fiche n'aborde pas non plus les microflores des fromages lactiques à croûte lavée (type Epoisses AOP, Langres AOP...).

Les fromages à pâte lactique voient, durant leur affinage, se succéder dans leur pâte et en surface, des micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) ayant tous des fonctionnalités qui vont conférer à ces fromages leur typicité et permettre d'obtenir une diversité de goûts, d'arômes, d'aspects et de textures. La composition microbiologique du lait et des fromages lactiques, ainsi que les facteurs jouant sur les écosystèmes microbiens en cours d'affinage sont encore mal connus. Cette fiche vise donc à présenter l'état des connaissances actuelles sur les micro-organismes qui contribuent à l'affinage des fromages à pâte lactique en abordant :

- Leur classification générale,
- Leurs origines, conditions de développement et rôles dans l'affinage des fromages à pâte lactique,
- Les réservoirs ou vecteurs de ces flores (lait cru, ambiance, matériel...) et les méthodes d'ensemencement (indigènes ou commerciales) possibles.

Classification des flores d'affinage et rôles dans l'affinage des fromages

Différentes microflore vont intervenir durant l'affinage des fromages (tableau 1 et annexe 1). Les micro-organismes situés à la surface des fromages sont les principaux agents de l'affinage, mais ceux présents dans la pâte vont également jouer un rôle. Ces micro-organismes proviennent du lait cru mis en fabrication, des ferments indigènes (lactosérum...) ou commerciaux, de l'eau, du matériel, et de l'ambiance de fromagerie.

Ils sont de natures diverses : bactéries et/ou levures et moisissures (champignons microscopiques, pour la part la mieux connue (tableau 1)). Ils sont présentés car ils ont un intérêt technologique et qu'il est important pour les producteurs et les techniciens de mieux les connaître. Dans le cas d'utilisation de ferments du commerce, ceci leur permettra aussi de mieux choisir leurs ferments d'affinage.

Il est cependant important de noter que certaines flores d'affinage peuvent avoir un intérêt dans certaines technologies fromagères et s'avérer indésirables dans d'autres (cas du *Mucor* par exemple).

Tableau 1 : Synthèse des principaux genres de microorganismes rencontrés au cours de l'affinage des fromages (Source : ouvrage « Microflore du lait cru », juillet 2011)

Règne	MYCETES (champignons)		BACTERIES		
	Levures	Moisissures	Bactéries lactiques	Staphylocoques et bactéries coryneformes	Autres bactéries à Gram négatif
Genres	<i>Geotrichum</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Yarrowia</i>	<i>Penicillium</i> , Mucorales, <i>Rhizopus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Brevibacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>

Rôles des différents micro-organismes dans l'affinage des fromages à pâte lactique et leurs conditions de développement

Les bactéries

Dans cette catégorie, deux principales « familles » vont participer à l'affinage des fromages : les bactéries lactiques et les bactéries d'affinage (tableau 2).

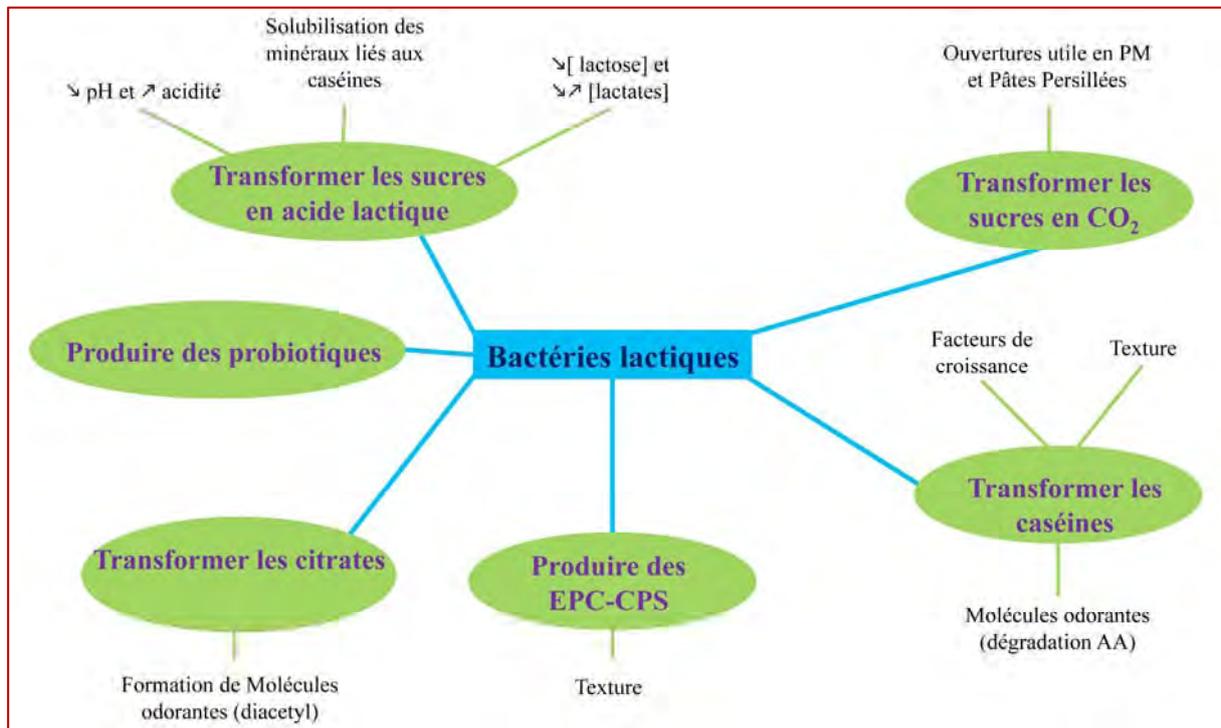
Tableau 2 : Principales bactéries intervenant durant l'affinage des fromages et leurs fonctionnalités (Source : Y. Gaüzere, Enilbio Poligny, support de formation)

Famille	Genres et espèces	Principales fonctions
Bactéries lactiques	Lactocoques et Streptocoques (<i>Lactococcus cremoris</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ...)	Acidification et contribution à la protéolyse
	Leuconostocs	Ouverture de la pâte (production de gaz), acidification production de composants d'arômes
	Lactobacilles mésophiles (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> ...)	Production de composants d'arômes
	Entérocoques (<i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> ...)	Acidification, protéolyse et contribution à la lipolyse, coloration des croûtes
Bactéries d'affinage	Microcoques : <i>Micrococcus caseolyticus</i> , <i>M. conglomeratus</i> ...	Protéolyse, dégradation des acides aminés
	Bactéries corynéformes : <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Brevibacterium</i> dont <i>B. linens</i> , <i>Microbacterium sp.</i>	Coloration des croûtes, protéolyse et lipolyse
	Staphylocoques à coagulase négative (<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>S. equorum</i> ...)	Coloration des croûtes, glycolyse, et lipolyse

Les bactéries lactiques

Caractéristiques générales et rôles dans l'affinage

La flore lactique est essentiellement acidifiante, mais il lui est reconnu une action sur l'affinage, via son implication dans la glycolyse et également, dans une moindre mesure, par rapport à son activité protéolytique (figure 1).



*EPC : Exopolysaccharides et CPS : Polysaccharides Capsulaires

Figure 1 : rôles des bactéries lactiques

Source : S. Roustel, journée technique Profession Fromager, 2014

- **La glycolyse** (tableau 3) reste la voie métabolique dominante mise en œuvre par les bactéries lactiques. Par la dégradation de substrats comme les citrates, cette dernière entraîne la formation de composés aromatiques. Parmi les espèces d'intérêt pour l'affinage, on peut citer :
 - **Lactococcus lactis**, sous-espèce *diacetylactis*, qui fermente le citrate en produisant du diacétyle. Cette molécule est très importante pour les produits laitiers car elle est à l'origine des arômes beurrés, noisette et l'odeur de crème (Le Mens, 2008) ;
 - **Les Leuconostocs** quant à eux libèrent des composés aromatiques et produisent du gaz carbonique entraînant la formation de cavités/trous dans la pâte du fromage et à la surface des fromages (surface lunaire), ce qui les rend d'ailleurs parfois « indésirables » lorsqu'ils sont en quantités trop importantes (guide accident, partie « trous précoces », Institut de l'Elevage *et al.*, 2007) ;
 - **Les entérocoques** ont généralement un pouvoir acidifiant limité. Grâce au métabolisme du citrate ils influencent positivement le développement d'une flaveur typique des fromages. Les entérocoques les plus couramment présents dans les fromages sont *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* (Giraffa, 2003). Des souches de *E. faecalis* et de *E. faecium*, cultivées dans des laits de chèvre et de brebis, produisent du lactate en grande quantité, puis du formate et de l'acétate.

Tableau 3 : Micro-organismes et enzymes associés : glycolyse (Choisy *et al.*, 1997, in Vignola, 2002)

Enzymes ou voie métabolique	Source d'enzyme	Substrat	Molécules produites
β -galactosidase	Bactéries lactiques	Lactose	Glucose Galactose Acide lactique
Voie homofermentaire	Bactéries lactiques	Glucose Galactose	Lactates Acide lactique (post acidification)
Voie hétérofermentaire	<i>Leuconostocs</i>	Glucose Galactose	Lactates Ethanol Acétate CO ₂ Acide lactique
Voie du citrate	<i>Lactococcus lactis spp</i> <i>Lactococcus diacetylactis</i> <i>Leuconostocs</i>	Citrate	Acetate Diacétyle Acétoine CO ₂
Voie du propionate	<i>Propionibacterium</i>	Lactate	Propionate acide gras en C3 et acide acétique C2 acétate

- **Concernant l'activité protéolytique** des bactéries lactiques, le fractionnement des caséines modifie la texture de la pâte, et certains des peptides et des acides aminés libérés sont des précurseurs de substances aromatiques. Cependant, la plupart des études menées sur le sujet portent sur le rôle des bactéries lactiques thermophiles dans la protéolyse, peu de références existant sur les bactéries lactiques mésophiles. On peut cependant citer une étude (Desmazeaud et Vassal, 1979), ayant mis en évidence l'activité de dégradation des protéines durant l'affinage par des *Lactococcus lactis* et *diacetylactis*. L'activité protéolytique des entérocoques a un effet positif sur la texture. *E. faecalis* se différencie des autres entérocoques par une forte activité protéolytique.

A noter que les bactéries lactiques peuvent aussi avoir un effet négatif sur la qualité des fromages : l'hydrolyse de la caséine peut libérer des peptides amers.

- **La lipolyse** : Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques (De Roissart et Luquet, 1994) par comparaison avec d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Flavobacterium* (Brennan *et al.*, 2002). Cependant leur présence dans les fromages à des concentrations élevées et pendant des périodes plus ou moins importantes, peut les amener à libérer des quantités non négligeables d'acides gras libres (Das *et al.*, 2005). Bien que menée en laboratoire et sur milieu de culture, une étude a mis en évidence une activité lipolytique significative des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc* (Karam *et al.*, 2012).

La capacité à hydrolyser les triglycérides du lait est la deuxième propriété essentielle des entérocoques, la plupart des entérocoques n'exerce généralement qu'une faible activité lipolytique malgré quelques exceptions. La plus forte production d'acides gras volatils s'observe après 10-15 jours d'incubation pour quelques souches, même si elle se décèle après cinq jours d'incubation pour *E. faecalis* et *E. faecium*.

- **La production d'EPC et CPS** par les bactéries lactiques est une propriété exploitée notamment pour travailler sur la texture des produits (yaourts par exemple). Cependant cette particularité n'est à notre connaissance pas exploitée pour la fabrication des fromages à pâte lactique.

Conditions de développement

Ne seront traitées, dans cette partie, que les bactéries lactiques intervenant en transformation de fromages à pâte lactique, à savoir les bactéries lactiques mésophiles.

- **Température :**

Par définition, le terme « mésophile » désigne des organismes dont la température optimale de croissance est située au-dessus de la température ambiante (20°C) et en dessous de celle du corps humain (37°C) (De Roissart et Luquet, 1994). Les bactéries lactiques mésophiles sont détruites par la pasteurisation. La température optimale de multiplication des bactéries lactiques mésophiles se situe entre 20 et 37°C, mais la multiplication est possible entre 10 et 37°C (tableau 4).

Tableau 4 : Températures optimales et extrêmes de croissance des bactéries lactiques mésophiles (De Roissart et Luquet, 1994)

Genres bactériens	Températures optimales	Températures extrêmes
<i>Leuconostoc</i>	18 - 30°C	0 - ≤ 40°C
<i>Lactococcus</i>	27 - 32°C	≤ 10 - ≤ 40°C
<i>Lactobacillus (mésophile)</i>	30 - 35°C	≤ 15 - ≤ 45°C
<i>Enterococcus</i>	30 - 40°C	≤ 10 - ≤ 50°C

Certains auteurs rapportent que les lactocoques et certains *Leuconostocs* (*lactis*, *cremoris*, *mesenteroides* et *dextranicum*) peuvent se développer à 10°C (Hermier *et al.*, 1992). Nunez *et al.* (1984) ont montré que dans les laits crus de brebis réfrigérés *Leuconostoc dextranicum* est l'espèce de bactérie la plus fréquemment isolée. Enfin, les entérocoques (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*), intervenant plutôt pour leurs propriétés aromatiques, sont également capables de se multiplier à 10°C.

- **pH :**

La croissance des bactéries lactiques et les activités enzymatiques qui en découleront sont aussi très influencées par le pH (tableau 5).

Tableau 5 : Influence du pH du milieu sur la croissance des bactéries lactiques (De Roissart et Luquet, 1994)

Genres	pH optimaux
<i>Lactobacillus</i>	5,5 - 6,2
<i>Pediococcus</i>	5,5 - 6,5
<i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i>	6,3 à 6,5 mais certains sont capables de se développer entre 4,8 et 5,2 en technologie lactique durant le caillage
<i>Enterococcus</i>	7,0

- **a_w :**

La croissance des bactéries lactiques n'est plus possible à des a_w inférieures à 0,91. L'a_w des fromages lactiques jusqu'à 14 jours d'affinage ne semble pas être un facteur limitant puisque une expérimentation menée dans le cadre du programme LACTAFF (Lefrileux *et al.*, 2016) (conditions d'affinage de 10 ou 14°C croisées à des hygrométries de 88 ou 98 %) montre que les a_w des fromages lactiques affinés dans ces conditions sont supérieures à 0,96.

Les bactéries d'affinage : caractéristiques générales et rôles dans l'affinage des fromages (Staphylocoques, microcoques et bactéries corynéformes)

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) figurent parmi les bactéries dominantes des laits crus de chèvre (Tormo *et al.*, 2007). Il est désormais connu, même si les travaux ne portent pas spécifiquement sur des fromages à pâte lactique, qu'ils interviennent dans l'affinage de nombreux fromages à croûte fleurie ou lavée (Irlinger *et al.*, 1997).

Certaines espèces, connues pour leur capacité à pigmenter la surface des fromages (*S. xylosus*), sont utilisées en fabrication de fromages à croûte lavée. D'autres espèces sont connues pour leur rôle dans la glycolyse et la protéolyse des fromages permettant ainsi la formation de différents composés (alcools, acides, cétones...) qui vont conférer aux fromages des notes aromatiques diverses (Corbière Morot-Bizot, 2006). Ces espèces possèdent certaines fonctions permettant l'amélioration de la texture et du goût du fromage. Enfin, dans la littérature, il n'existe que très peu de données concernant l'implication des SCN dans la lipolyse des fromages.

Les microcoques et bactéries corynéformes sont des bactéries retrouvées de manière importante à la surface des fromages, en particulier sur les fromages à croûte lavée, lactiques et d'autres technologies. Ce sont des bactéries protéolytiques, conduisant notamment à la formation de composés soufrés aromatiques.

Les levures

Généralités sur les levures

Caractéristiques générales et rôles dans l'affinage des fromages

Les levures sont principalement retrouvées en surface des fromages de chèvre, à un seuil moyen de 10^8 UFC/g, la flore interne étant environ 100 fois moins abondante (Nahabieh et Schmidt, 1990). Lenoir *et al.* (1983) donnent un rapport de 100 à 1000 fois moins de levures au cœur de la pâte qu'en surface.

Les genres les plus fréquemment retrouvés en transformation fromagère sont *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida* et *Geotrichum* (Nahabieh et Schmidt, 1990). Ce dernier genre revêt un caractère particulièrement important puisqu'il est toujours présent et parfois abondamment (environ 10^7 UFC/g) en surface des fromages de chèvre à pâte lactique (voir partie suivante spécifique au *Geotrichum*). Selon les fabrications (fermières/industrielles, au lait cru/au lait pasteurisé) l'importance relative de toutes ces espèces est très variable. Toutefois les ensemencements utilisés lors de la fabrication des différents fromages étudiés, ne permet pas de faire le distinguo entre la part de flores indigènes naturellement présentes et la part de flores apportées par les levains commerciaux.

Tableau 6 : Genres de levures les plus couramment rencontrées sur les fromages lactiques et principales fonctions

Famille	Genres	Principales fonctions
Levures	<i>Kluyveromyces</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i>	Désacidification, protéolyse (modérée pour <i>Kluyveromyces</i> et <i>Debaryomyces</i>) et lipolyse (sauf pour <i>Kluyveromyces</i> et <i>Debaryomyces</i>), estérification des globules gras
	<i>Geotrichum</i>	Feutrage superficiel, désacidification, protéolyse et lipolyse

Les levures se multiplient principalement par une voie végétative, le bourgeonnement, mais parfois par scission, selon les genres. Certaines peuvent avoir aussi une reproduction sexuée.

Les levures peuvent assimiler les sucres en présence d'oxygène, c'est la respiration, ou sans oxygène, c'est la fermentation. Cependant certaines espèces de levures ne sont pas capables de fermenter ou fermentent très peu (*G. candidum*, certaines *Candida*). Lors de l'affinage, ces deux phénomènes coexistent et ont une utilité technologique.

Chronologiquement lors de l'affinage, un des premiers rôles des levures est la réduction des sucres résiduels du fromage (assimilation ou fermentation des sucres) entraînant notamment la production de gaz (CO₂) en anaérobiose et de composés conférant parfois des odeurs très caractéristiques de fruits mûrs ou alcool (tableau 7). A l'excès, cela peut entraîner des défauts de goût et d'aspect. Certaines (*Kluyveromyces* et *Debaryomyces*) assimilent le lactose résiduel. En catabolisant le lactate (essentiellement *G. candidum* et *D. hansenii*), elles neutralisent la surface des fromages ce qui stimule la croissance d'autres levures, de bactéries acido-sensibles (microcoques et bactéries corynéformes) et de certaines moisissures (Choisy *et al.*, 1997). Les levures du genre *Kluyveromyces* ont la capacité de consommer le lactate, et ainsi de participer à la désacidification du caillé (Kagkli *et al.*, 2006 ; Cholet *et al.*, 2007). On parle parfois de phase de levuration pour désigner cette étape.

Par ailleurs, leurs activités protéolytiques et lipolytiques peuvent être importantes mais restent variables selon les souches (tableau 7). Elles contribuent à la protéolyse en libérant des acides aminés et en réduisant l'amertume par la dégradation des peptides amers.

Tableau 7: Différences d'activités selon les souches de levures (Source : Y. Gaüzere, support de formation)

Souches	<i>Candida utilis</i> (« CUM »)	<i>Kluyveromyces lactis</i> (« KL »)	<i>Debaryomyces hansenii</i> (« DH »)
Fermentation			
• Glucose	+	+	-
• Lactose	-	+	-
Assimilation			
• Lactose	-	+	+
• Lactate	+	+	+
Neutralisation pH	+++	+	++
Aromatisation	++	+++	+
Croissance			
• surface	+++	+++	+++
• profondeur	+++	+++	+

Les levures contribuent de façon limitée à la lipolyse (sauf *G. candidum*). Cependant parmi elles, *Yarrowia lipolytica* est la levure qui possède le plus de lipases décrites (Fickers *et al.*, 2011). Les fortes activités protéolytiques et lipolytiques de *Y. lipolytica* en font une levure technologique intéressante, mais la rendent difficile à maîtriser.

Les levures produisent du gaz et des composés aromatiques. Certaines peuvent mettre en œuvre des mécanismes fermentaires (*K. lactis*, *K. marxianus* et *D. hansenii*) entraînant la production d'alcool. Les levures du genre *Kluyveromyces* sont capables de produire des composés d'arôme variés, principalement des esters aux notes fruitées et des alcools.

Les levures contribuent à l'aspect extérieur du fromage. Enfin, elles peuvent protéger contre les contaminants de surface tels que *Mucor* ou *Penicillium* (car pousse rapide).

Le lactosérum de surface (prélevé en surface des bacs de caillage après 24 h à 48 h de caillage et servant au repiquage), peut parfois être très chargé en levures, jusqu'à 10⁶ UFC/ml mais leurs quantités sont variables selon les éleveurs (de 10² à 10⁶ UFC/ml) mais également, selon la période, au sein d'une même exploitation (Slavina, 2008).

D'une façon générale il faut retenir leur rôle dominant et positif dans l'affinage des fromages à pâte lactique. Cependant elles peuvent aussi engendrer des accidents de fabrication, notamment en cas de développement excessif (trous précoces, peau de crapaud, surface collante, visqueuse). Ces derniers sont traités dans le guide accidents de fromagerie (Institut de l'Elevage, 2007).

Conditions de développement

- **Température :**

Les levures sont capables de se développer dans une gamme de température allant de 4°C à 30°C, avec un optimum situé entre 20 et 28°C.

- **pH :**

Elles sont globalement peu sensibles aux variations de pH, ce dernier n'étant donc pas un facteur limitant aux pH rencontrés en transformation fromagère.

Les levures *Candida utilis* vont permettre une remontée du pH plus rapide et plus importante, surtout sur des fromages démoulés très acides. Elles se développent en surface mais aussi à cœur et ont aussi des propriétés aromatisantes intéressantes pour les fromages lactiques.

- **a_w et Sel :**

En général en fromagerie l'a_w est non limitante sur le développement des levures. Pour permettre leur développement, l'a_w doit être supérieure à 0,85 ce qui est le cas de la quasi-totalité des fromages. Elles sont plutôt tolérantes au sel, sauf *Geotrichum candidum*.

- **O₂ :**

Leurs besoins en oxygène sont d'autant plus importants que la température est élevée. Si l'O₂ est limitant, certaines levures passent d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme fermentaire avec production d'alcool, bien que la production d'alcool puisse se faire aussi en surface des fromages dès les 1ers jours d'affinage, par *Kluyveromyces marxianus* et *Debaryomyces hansenii* (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).

Tableau 8 : Synthèse des conditions de développement des levures en général et *G. candidum* en particulier (source : Y. Gaüzere, Enilbio Poligny, support de formation)

	Levures	<i>G. candidum</i>
Température	Optimum : 20-30°C Ralenties à 4-8°C	Optimum : 25-30°C Très ralenti entre 4 et 8°C
pH	Optimum : 4,5 à 6 Développement possible entre 4 et 6,5	Optimum : 5,5 à 7 Développement possible entre 4,6 et 5,3, voire en dessous
a_w	> 0,90-0,95	0,95-1 Tolérance jusqu'à 0,90
O₂ et CO₂	Atmosphère confinée à très oxygénée	Besoin d'oxygénation, supporte mal le confinement
Rapport sel sur eau	Très variable : jusqu'à 12-15 % pour DH, 7-8 % pour <i>Kluyveromyces</i>	Sensibilité à partir de 2-3 %

Geotrichum

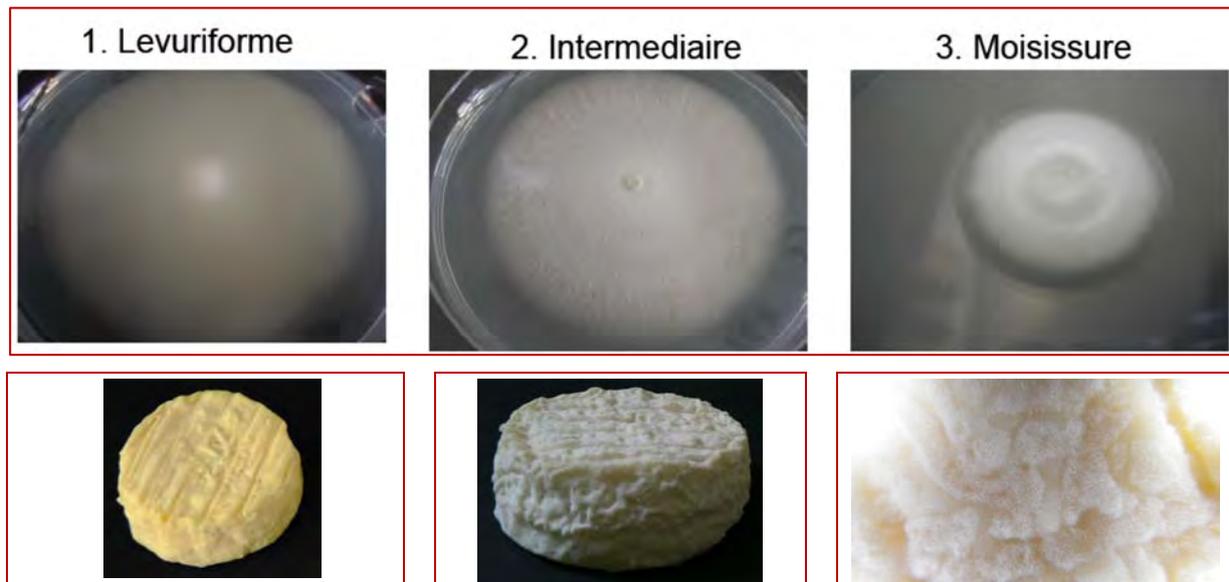
Caractéristiques générales

Le *Geotrichum* est une levure qui peut se présenter sous différentes formes morphologiques.

Différents types morphologiques de *Geotrichum candidum*

La particularité du *Geotrichum* est la diversité de formes morphologiques sous lesquelles on peut le retrouver. L'étude des caractères des cultures de *G. candidum* sur différents milieux solides (Guéguen et Jacquet, 1982) montre qu'il est possible de différencier 3 types morphologiques sur l'unique milieu à l'extrait de malt (voir photos 1 à 6) :

- **Type 1 : souches de couleur crème, à l'aspect levuriforme**, à température optimale située entre 22 et 25°C, à croissance plus réduite à 30°C, à production abondante d'arthrospore et à activité protéolytique faible.
- **Type 2 : souches dites « intermédiaires »**, poudreux sous les doigts, peu feutrants.
- **Type 3 : souches bien blanches, plus ou moins feutrées**, à température optimale plus élevée (25-30°C), à croissance plus faible à 22°C, sporulant peu, produisant en milieux liquides des mycéliums plus importants que les souches du type 1 et à activité protéolytique plus marquée.



Photos 1 à 6 : exemples des 3 formes du *Geotrichum*, sur boîtes de Pétri et sur fromages à pâte lactique : levuriforme, intermédiaire et type moisissure

Sources : journée Profession Fromager intervention F. Buret (2014),
J. Barral, Chambre d'Agriculture de l'Hérault et C. Reynaud, Actalia Produits Laitiers

G. candidum joue un rôle important dans la fabrication fromagère, en particulier durant l'étape d'affinage où elle apparaît très tôt. *G. candidum* libère des enzymes comme des lipases et des protéases. L'activité de ces dernières libère des acides gras et des peptides pouvant être métabolisés par les autres populations microbiennes et qui contribuent au développement des saveurs et des autres qualités du fromage.

G. candidum n'assimile pas le lactose, mais joue un rôle important dans la désacidification du fromage en consommant l'acide lactique et en produisant de l'ammoniac par la dégradation des acides aminés (Soulignac, 1995 ; Mounier *et al.*, 2008).

Concernant la protéolyse, d'une souche de *Geotrichum* à l'autre, les variations d'activités présentent une assez grande amplitude (Guéguen et Lenoir, 1975). De nombreuses publications font état de son

implication dans la fabrication d'arôme. Des composés soufrés volatiles (CSV) peuvent être produits (Demarigny *et al.*, 2000), mais également des composés aux senteurs florales, fruitées (Molimar et Spinnler, 1996).

D'autre part la forte activité amino-peptidasique de *Geotrichum* permet de diminuer l'amertume par dégradation des peptides amers produits par *P. camemberti* (Raynal, 2002) et autres *Penicillium*.

Geotrichum candidum présente une activité lipolytique entraînant la libération de différents acides gras (Millet, 1998). Gaborit et Raynal-Ljutovac (2008), en comparant les profils sensoriels de 2 souches de *Geotrichum candidum* (Gc) à 2 souches de *Penicillium camemberti* (Pc), ont montré que les 2 souches de Gc permettaient d'obtenir des notes « chèvre » plus marquées, alors que les Pc produisent des notes « champignon ». Cela illustre bien la diversité des odeurs et arômes produits selon les souches en présence.

Enfin, la rapidité de croissance et d'implantation de certaines souches peut lui conférer un rôle de couverture et de lutte contre les contaminants (notamment vis-à-vis du *Mucor*, responsable de l'accident du « poil de chat »). En 48 h, Gc peut avoir largement recouvert les fromages. Les métabolites produits par *G. candidum* peuvent aussi inhiber les flores de contaminations telles que *Listeria monocytogenes* (Dieuleveux *et al.*, 1997 ; 1998), et sont capables d'inhiber la croissance ou la sporulation de *Mucor sp.* (Boutrou et Guéguen, 2005).

Conditions de développement

- **Température :**

Geotrichum candidum se développe dans une plage de température optimale comprise entre 22 et 30°C selon les souches, l'optimum étant en général proche de 28°C. La fourchette de développement possible se situe entre 8°C et jusqu'à 40°C pour certaines souches.

- **pH :**

Son pH optimum est de 5,5 à 7 mais il peut tolérer de grandes variations (développement possible de certaines souches à partir de pH 4,6, voire 3 ou 3,5). Concernant l'impact du pH sur l'activité protéolytique du Gc, Gueguen et Lenoir (1976) indiquent que des préparations enzymatiques issues de différentes souches de Gc ont un optimum d'activité dans une zone de pH comprise entre 5,5 et 6,0.

- **Sel :**

Gc est un des microorganismes les plus sensibles au sel, son inhibition étant totale à 5-6% (sur milieu de culture). Afin d'optimiser son implantation en surface des fromages il est possible de décaler le salage dans le temps et attendre 24 h avant d'appliquer le sel en surface du fromage (voir fiches « Croûtage « blanc-ivoire » souhaité » et « Croûtage « bleu » souhaité »).

- **Oxygénation :**

G.candidum a la capacité de se développer en tension basse d'O₂, avec des variations selon les souches. Malgré tout, en cas d'ambiance un peu « confinée », il peut être supplanté par certains *Penicillium* (bleus) si ces derniers sont bien présents dans l'ambiance et sur les fromages.

Les moisissures

Caractéristiques générales et rôles dans l'affinage des fromages

Durant l'affinage, le rôle des moisissures peut être multiple : désacidification, protéolyse, lipolyse, formation de la croûte et aspect du fromage. Les moisissures sont les micro-organismes les plus lipolytiques (en dehors du cas de la levure *Yarrowia lipolytica*) des fromages.

Sur le plan technologique, les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Penicillium*. Les 2 principales espèces de *Penicillium* utilisées en fromagerie sont *P. camemberti* (anciennement aussi nommé *P. candidum*), et *P. roqueforti*, mais le genre *Penicillium* comprend environ 200 espèces. A la surface des fromages il est donc possible de retrouver une grande variabilité d'espèces entraînant une grande diversité d'aspects, de textures et de couleurs.

P. roqueforti n'est pas une moisissure utilisée et recherchée dans et en surface des fromages à pâte lactique. Il ne sera donc pas développé ici.

En revanche lorsque du bleu est recherché dans l'affinage des fromages lactiques, l'espèce souhaitée est *Penicillium album*. Le *Penicillium album* apporte une couverture blanche, laineuse, passant rapidement au gris clair/bleu. Certains auteurs le rapprochent d'ailleurs de *P. camemberti*.

D'autre part, une étude menée sur l'accident du bleu sur les fromages à pâte lactique (Laithier *et al.*, 2006) a mis en évidence la présence de onze espèces différentes de *Penicillium* sur l'ensemble des fromages analysés (régions Rhône-Alpes et PACA). Bien que les producteurs suivis aient considéré la présence de bleu comme un frein commercial, un certain nombre de bleus présentaient des caractéristiques d'aspect et de goûts tout à fait satisfaisants.

Tableau 9 : Différentes espèces de « bleus » (*Penicillium*) retrouvées en surface de fromages de chèvre à pâte lactique (Source : Claire Bartschi)

Espèces	Description sur le fromage
<i>P. aurantiogriseum</i> (= <i>P. solitum</i> , <i>P. cyclopium</i>)	Bleu très clair, ressemble à <i>P. expansum</i>
<i>P. chrysogenum</i>	Bleu ciel assez couvrant
<i>P. expansum</i>	Bleu ciel étalé sur le fromage
<i>P. glabrum</i>	Bleu ciel évoluant vers le gris assez couvrant
<i>P. nalgiovense</i> (~ <i>chrysogenum</i>)	Bouffe blanche puis bleu ciel
<i>P. griseoroseum</i> (= <i>chrysogenum</i>)	Bleu ciel assez couvrant

Certaines espèces sont très proches entre elles (*P. chrysogenum* et *P. griseoroseum*), sans pour autant avoir le même aspect sur les fromages. La grande majorité des espèces de *Penicillium* retrouvées dans le cadre de cette étude ont été retrouvées sur d'autres fromages.

Penicillium camemberti est le champignon des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, type Camembert, Brie ou Carré de l'Est (Lenoir *et al.*, 1983), ou de certains fromages de chèvre (Choisy *et al.*, 1997b). Il peut parfois être utilisé en fabrication de fromages à pâte lactique, comme pour le Neufchâtel par exemple.

Il possède un système protéolytique complexe et une activité lipasique importante, ce qui lui confère un rôle important dans l'aromatisation des fromages. *P. camemberti* joue également un rôle majeur dans la maturation des fromages à croûte fleurie, notamment en consommant le lactate et en produisant de grandes quantités de CO₂ qui changent l'environnement gazeux des hâloirs. De plus, en se développant, le mycélium de *P. camemberti* forme une barrière qui contribue à limiter la prolifération de bactéries pathogènes et de moisissures indésirables (Bockelmann *et al.*, 1999). Il possède donc certaines caractéristiques biochimiques qui en font un micro-organisme indispensable à la maturation des fromages à pâte molle et à croûte fleurie. *A contrario*, plusieurs espèces de *Penicillium*, comme *P. verrucosum*, *P. roqueforti*, *P. expansum*, *P. janthinellum*, *P. cyclopium* peuvent fortement déprécier l'aspect des fromages à pâte molle. Présents en trop grande quantité, ils peuvent provoquer l'apparition de tâches bleu-vert plus ou moins grandes à la surface du fromage. Ces défauts d'aspect sont connus sous le nom d'accident du « bleu » (guide accident) et souvent accompagnés de goût ou odeur de terre, vieille cave, renfermé caractéristique.

Les photos ci-dessous montrent quelques exemples des aspects que peuvent revêtir les espèces du genre *Penicillium* hors accidents de fabrication (photos 7 à 10).

Afin d'aller plus loin sur la maîtrise du croûtage bleu, cf. fiche « Croûtage « bleu » souhaité ».



Photos 7 à 10 : Quelques exemples de couvertures en *Penicillium* sur des fromages de type lactique (hors accident)
Sources : S. Morge, PEP caprin Rhône-Alpes, M. Pétrier, CTFC, G. Allut, CFB

Conditions de développement

Comme pour les autres microorganismes présentés précédemment, la diversité de souches entraîne une grande variabilité de vitesses de croissance, d'intensités des activités protéolytique et lipolytique.

Paramètre	<i>Penicillium camemberti</i>	<i>Penicillium album</i>
Température	Optimum : 20-22°C Minimum : 6°C	De 4 à 30°C
pH	Optimum : 5,1 à 7 Inhibé à 4,8	Optimum : 4 à 5 Tolérance de 3 à 8
a_w et sel	Optimum 0,95-1 Tolérance jusqu'à 0,90	Tolère des concentrations en sel jusqu'à 20%, avec un optimum à 2% puis diminution de sa croissance à partir de 5%
Oxygénation	Besoin d'oxygénation, tolérance au confinement	Aérobic strict

- **Température :**

La plupart des espèces de *Penicillium* ont une température optimale de croissance à 25°C, en particulier pour *Penicillium roqueforti* (Gock *et al.*, 2003). Pour *P. camemberti* l'optimum se situe à 20°C. Plusieurs moisissures ont la possibilité de se développer sur des produits stockés réfrigérés (par exemple certains producteurs utilisent un passage en chambre froide pour favoriser la pousse du *Penicillium*) : c'est notamment le cas de *P. roqueforti*, *P. expansum*, *P. brevicompactum*. et *P. verrucosum*. Elles peuvent également avoir une bonne résistance aux températures élevées. Vadillo *et al.* (1987) démontrent que

Penicillium est un des genres les plus fréquemment rencontrés après la pasteurisation basse (63°C pendant 30 min).

- **pH :**

Si la plupart des champignons sont peu affectés par le pH, dans les limites de 3 à 9, un milieu légèrement acide 5 à 6 est favorable à la germination et à la croissance de la plupart des moisissures (Mahaut *et al.*, 2000).

- **Oxygène :**

Les moisissures ont un besoin absolu d'oxygène pour se développer. Elles sont aussi sensibles aux teneurs élevées en gaz carbonique. C'est le cas de *P. camemberti*. Cependant, certaines moisissures, comme *P. roqueforti*, peuvent supporter des teneurs très limitées en oxygène.

D'autres espèces de *Penicillium* doivent également tolérer des ambiances plus « confinées » puisqu'un certain nombre d'observations faites en fromagerie montrent que lorsque les retournements sont insuffisants en hâloir, les surfaces des fromages sont différentes (manque d'oxygénation sur une face, en général celle qui est en contact avec la grille). De même, certains producteurs souhaitant le développement du *Penicillium* en surface de leurs fromages ont des pratiques de confinement après une phase de démarrage de l'affinage au hâloir : draps sur les piles de fromages, mise en caisses, resserrement sur les grilles...

- **Sel :**

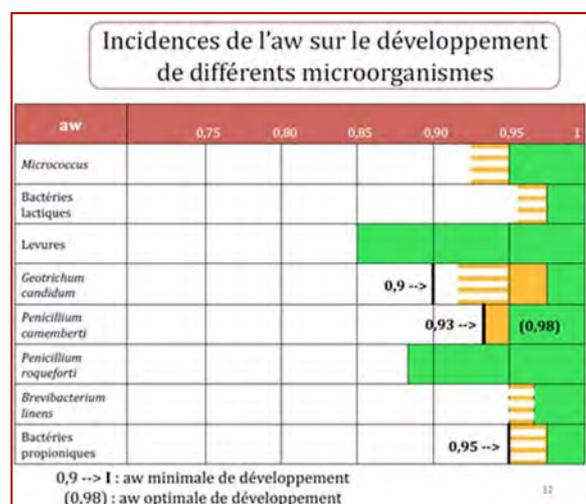
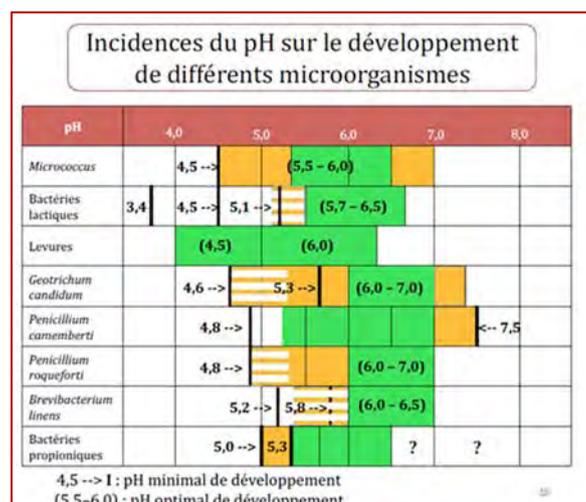
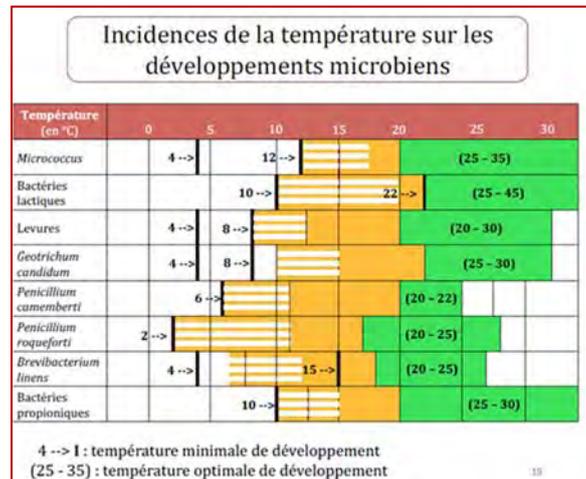
Les souches de *Penicillium* peuvent voir leur croissance légèrement stimulée aux faibles concentrations de sel, puis faiblement inhibées pour des fortes concentrations de 5 à 8%. Des concentrations de 15 à 20% sont nécessaires pour inhiber totalement leur croissance (Van den Tempel et Nielsen, 2000). De telles valeurs sont bien au-delà des concentrations en sel observées pour des fromages lactiques (cf. fiche « Croûtage « bleu » souhaité »).

- **a_w :**

L'a_w est un autre facteur important pour le développement de *Penicillium*. Selon Hermier *et al.* (1992), la majorité des moisissures se développent sur des milieux très humides (a_w > 0,95), ce qui est le cas de la grande majorité des fromages. Mais certaines espèces de *Penicillium* peuvent aussi se développer à des a_w plus faibles. D'après Gock *et al.* (2003), la germination de *P. roqueforti* est toujours possible pour une a_w de 0,82 à 25°C et 0,86 à 30°C. L'a_w minimale de pour *P. camemberti* se situe à 0,90.

Synthèse générale des conditions de développement des micro-organismes intervenant dans l'affinage des fromages

(intervention de B. Mietton à la journée technique Profession Fromager, 2014)



Figures 2, 3 et 4 : Synthèse des conditions de développement des principaux micro-organismes d'affinage

La succession des flores et leurs interactions durant l'affinage

Les schémas ci-après (figures 5 et 6 et photos 11 à 14) montrent la succession et les interactions des microorganismes durant l'affinage des fromages.

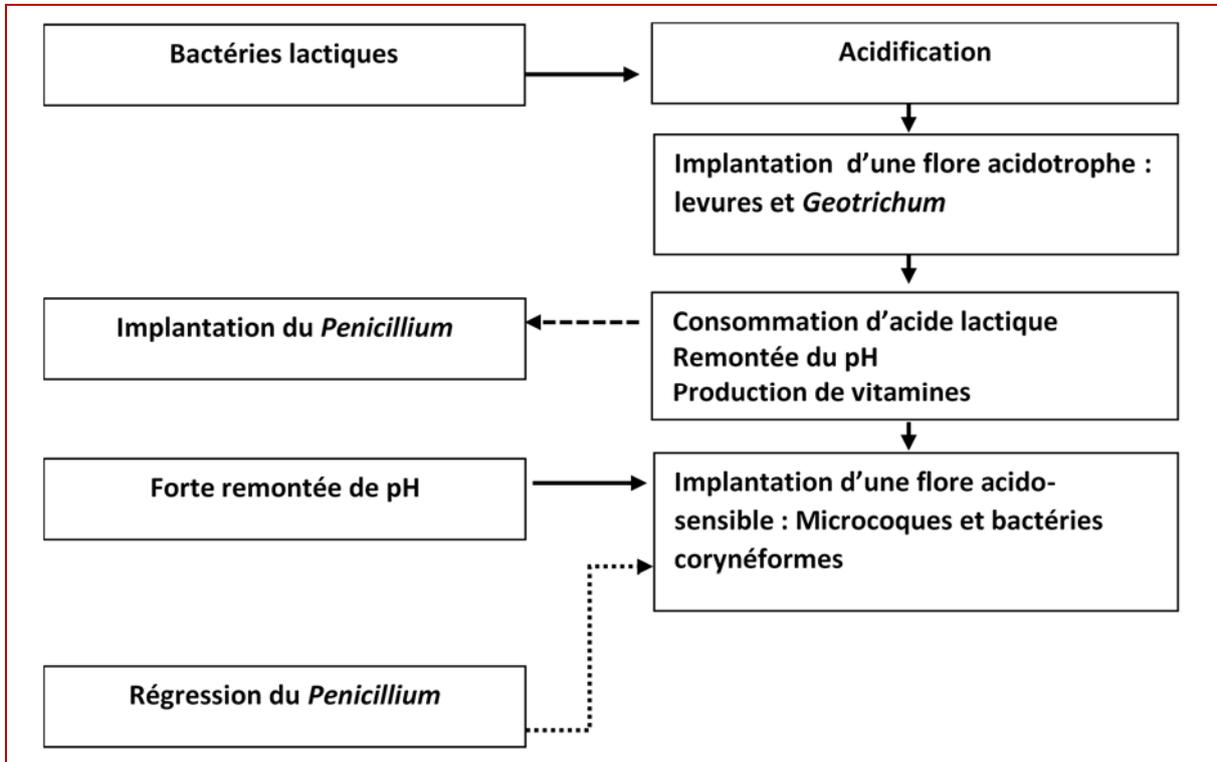


Figure 5 : Succession des microflores au cours de l'affinage
 Source : Y. Gaüzere, supports de formation



Photos 11 à 14 : Succession des microflores sur un fromage lactique à couverture « bleue »
 Source : G. Allut, CFB-CRAB

Après le travail d'acidification des bactéries lactiques et la production d'acide lactique notamment, des micro-organismes dits « acidotrophes » ou acidophiles, constitués de levures dont *Geotrichum*, vont utiliser les acides produits (ainsi que le lactose résiduel pour certaines levures) pour leur croissance. La remontée de pH due à cette consommation d'acides va permettre à certaines flores acido-sensibles (microcoques et corynébactéries) de se développer.

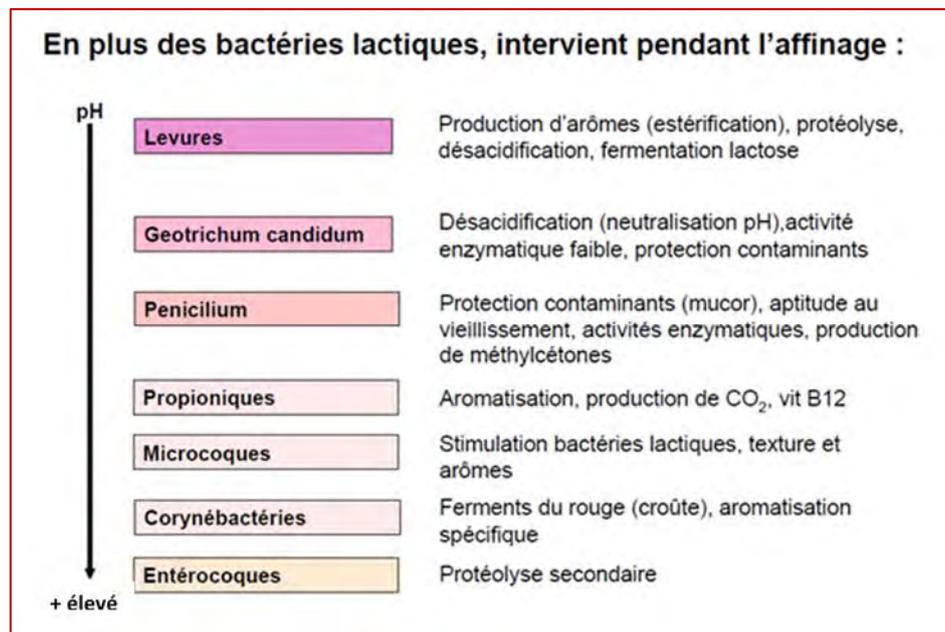


Figure 6 : Succession des flores d'affinage (schéma général pour tout type de fromage)
Source : cours Y. Gaüzere, ENILBIO Poligny

Origines et sources d'ensemencement en flores d'affinages

Quelles sont les flores d'affinage naturellement présentes dans les laits crus ? D'où viennent-elles ?
 (source : « Microflore du lait Cru », RMT Fromages de terroirs, juillet 2011)

Les micro-organismes retrouvés dans le lait à la ferme peuvent avoir de multiples sources : environnement des animaux, animaux eux-mêmes (peau du trayon), matériel de traite, trayeur...

Concernant plus spécifiquement les micro-organismes d'affinage (levures, moisissures et bactéries), des résultats d'étude montrent que :

- l'on retrouve en surface des trayons des niveaux variés mais importants de bactéries d'affinage telles que les staphylocoques à coagulase négative, les corynébactéries, et des flores lactiques en particulier des entérocoques,
- la machine à traire est un réservoir de flores à dominante lactique, dont des entérocoques, mais également des microcoques et des corynébactéries,
- l'air (prélèvements en salles de traite) contient des bactéries d'affinage (staphylocoques à coagulase négative et bactéries corynéformes) et des bactéries lactiques ainsi que des levures et moisissures.

Bien sûr, les quantités de micro-organismes, leur répartition et leur nature même (souche) vont varier en fonction des exploitations, ceci en lien avec les pratiques et l'environnement.

L'atelier de fabrication contribue-t-il à cet ensemencement ?

Dans les enquêtes en fermes menées dans le cadre de l'étude LACTAFF, des évaluations quantitatives et qualitatives des levures et moisissures retrouvées dans les ambiances des différentes pièces d'affinage (de la salle de fabrication au hâloir) ont été réalisées. La méthode a consisté à laisser des boîtes de Pétri ouvertes, durant 45 minutes, dans chacune des pièces dont l'ambiance devait être évaluée (photos 15 et 16). Les dénombrements ont été effectués sur 2 milieux nutritifs gélosés différents afin de permettre à toutes les flores fongiques de se développer (milieu MEAc et milieu MEAc salé) (Raynaud *et al.*, 2016).



Photos 15 et 16 : Evaluation des levures et moisissures présentes dans l'ambiance grâce à des boîtes posées photo de droite : boîtes laissées ouvertes en salle de fabrication durant 45 min puis photo de droite : les mêmes boîtes après plusieurs jours d'incubation sur lesquelles on peut observer le développement de moisissures (programme LACTAFF)

Source : M. Pétrier, Centre Technique des Fromages caprins de la région Centre

Les populations fongiques présentes dans les ambiances des différentes exploitations de toutes les régions sont qualitativement semblables : *Penicillium sp*, *Cladosporium sp*, *Aspergillus sp*, *Eurotium*, *Mucorales*. En Rhône-Alpes, une exploitation se distingue avec une ambiance plus variée *Scopulariopsis sp*, *Alternaria sp*.

Penicillium sp est le genre le plus représenté avec des espèces différentes, certaines xérotolérantes (qui tolèrent des a_w bases $< 0,85$ jusqu'à $0,73$). *Aspergillus sp* et *Eurotium sp* sont aussi des genres xérotolérants. Il est normal de retrouver ces genres de moisissures xérotolérantes dans l'écosystème que nous étudions où il y a présence de fourrages et de céréales (aliments « secs »), les bâtiments d'élevage se situant souvent à proximité de la fromagerie et/ou de la salle de traite.

Cladosporium sp est un genre que l'on retrouve systématiquement dans les ambiances aussi bien rurale que citadine et en toutes saisons.

En revanche, il est important de remarquer que le genre *Geotrichum* ne se retrouve que très peu voire pas dans les ambiances. Ceci paraît surprenant, les fromages ayant une flore *Geotrichum* importante mais il est vrai que le mode de reproduction de celui-ci n'est pas très favorable à une dispersion dans les ambiances contrairement aux genres *Penicillium* ou *Aspergillus*. Au vu de sa faible présence dans les ambiances, il est probable que le temps d'exposition à l'ambiance (45 minutes à 1 heure) des différents milieux nutritifs ne soit pas suffisant pour le révéler. Suite à ces résultats, on peut donc penser que l'ensemencement de *Geotrichum* se fait essentiellement par le lait chargé naturellement et les différents ferments (lactosérum ou autre) utilisés par les producteurs ainsi que par les différents matériels (bacs de caillage, moules...). Mais attention l'ambiance doit participer à cet « ensemencement » à plus petite échelle bien sûr, aussi une désinfection drastique des ambiances ne sera pas à préconiser.

Si qualitativement les populations fongiques sont semblables dans les différentes fermes étudiées, en revanche quantitativement il y a d'importantes variations :

- les exploitations des régions Bourgogne, Languedoc Roussillon, Rhône-Alpes et certaines de PACA subissent une forte pression de *Penicillium*,
- les exploitations du Centre, Poitou Charentes et certaines de PACA ont des ambiances très peu chargées en flores fongiques.

Les genres de moisissures révélées dans les ambiances sont le reflet des flores retrouvées en surface des fromages : dans les exploitations qui subissent une forte pression de *Penicillium*, les fromages ont des spots « bleu » voire une couverture « bleue » très importante en revanche dans les régions avec une ambiance peu chargée en flores fongiques, les fromages ont une couverture à dominante *Geotrichum*.

En ferme, il est aussi possible pour le producteur de faire une estimation de l'ambiance des différentes pièces de son atelier en utilisant la technique des boîtes de St Moret® (voir fiche PEP Caprin RA D110901 et photos 17 à 19).



Photos 17 à 19 : Evaluation de la mycologie de l'ambiance avec la technique des boîtes St Moret®
Sources : G. Allut, Centre Fromager de Bourgogne et S. Morge, PEP caprins Rhône-Alpes

Quels sont les apports indigènes en flores d'affinage ?

Le lactosérum

Utilisé de manière traditionnelle et largement employé en fromagerie fermière, le repiquage du lactosérum (appelé aussi petit lait) permet au fromager de s'assurer d'un apport indigène de flores lactiques et de flores d'affinage, et ceci à moindre coût (Laithier *et al.*, 2011).

La qualité du lactosérum, utilisé en repiquage dépend de différents paramètres, parmi lesquels la qualité du lait initial. En transformation au lait cru, et suivant le moment de la lactation, la qualité du lactosérum va donc aussi subir des fluctuations, entraînant parfois, pour ce qui concerne strictement la flore de surface, des retards (ou manque) dans le développement de cette dernière ou alors au contraire un développement excessif entraînant des croûtages type « peau de crapaud » ou bleu velouté intense, cartonueux.

Afin de pouvoir s'assurer, via l'utilisation du lactosérum, un ensemencement en *Geotrichum* et/ou *Penicillium* optimal, voici quelques recommandations :

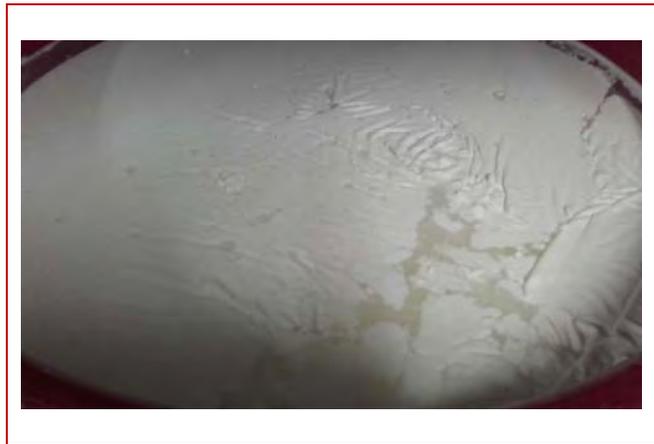
- le lactosérum utilisé pour le repiquage doit être prélevé en surface des bassines, là où les flores de surface seront les plus abondantes, le *Geotrichum* étant souvent visible, à 24 h ou plus,
- il doit bien évidemment être issu d'un caillé non accidenté, de couleur, d'aspect et d'odeur normaux.

Les autres méthodes « indigènes »

Lorsque l'apport de lactosérum dans le lait ne permet pas suffisamment d'atteindre ses objectifs de croûtage, d'autres méthodes indigènes peuvent aussi être mises en œuvre. Les méthodes décrites ci-dessous sont observées sur le terrain et fonctionnent chez ceux qui les utilisent. Toutefois elles n'ont pas été objectivées par des études techniques/scientifiques.

Pour induire et favoriser le *Geotrichum*

- Laisser un pot de lactosérum durant 24 à 48 h à température ambiante à l'abri des contaminations éventuelles (pot fermé mais il doit y avoir suffisamment d'air entre le niveau du sérum et le couvercle du pot) ; après ce délai on observe une pellicule blanche en surface du pot... venir la recueillir cette « fleur » (sans prendre de sérum en dessous) et utiliser en complément de son petit lait au moment de l'ensemencement (photos 20 et 21).



Photos 20 et 21 : Développement de *Geotrichum* en surface d'un pot de lactosérum conservé durant 24 h à température ambiante ; développement de *Geotrichum* en surface de la bassine en fin de caillage, avant moulage

Source : J. Barral, Chambre d'Agriculture de l'Hérault

- Certains producteurs étalent en surface de leurs bassines de caillage des fromages affinés (dont l'aspect correspond à leurs attentes) et répètent cette opération à chaque fabrication ; ainsi ils arrivent à obtenir le croûtage voulu de manière régulière.
- Il est aussi possible de mixer dans du lait un croûtage satisfaisant de la ferme et ensemercer le lait à l' emprésurage.
- Dans l'optique du redémarrage de leur production après la période de tarissement par exemple, ou même en cours de saison, afin de prévenir des problèmes de croûtage, certains producteurs mélangent un fromage entier dans un mélange de lait stérile et de lactosérum et utilisent ou congèlent ce mélange. Pour ceux qui ont l'habitude congeler leur lactosérum, cela permet un complément de flore de surface. Certains producteurs conditionnent ce mélange (croûte ou fromage mixé dans du lait) dans des bacs à glaçon avant congélation ce qui leur permet de « doser » leur ensemencement et pouvoir utiliser les « glaçons de croûte » en fonction des besoins, au cours de la saison.
- Sur les fromages : pas trop de sel et apport tardif, température de la salle de fabrication 20-22°C, ressuyage long (voir fiche « Croûtage « blanc-ivoire » souhaité »).

Pour induire et favoriser le *Penicillium*

- Saler tôt.
- Rentrer les fromages au séchoir dès le démoulage ou quelques heures après (sauf pour bleu moelleux) pour limiter l'implantation de *Geotrichum* = limiter le ressuyage.
- Sécher plus intensément.

- Limiter l'entrée d'oxygène dans les locaux → les *Penicillium* (bleus) ne semblent pas affectés par les limitations d'oxygène par contre les *Geotrichum* le sont, donc c'est en défavorisant les *Geotrichum* qu'on permet à *Penicillium* de se multiplier.
- Faire implanter des levures (de type CUM par exemple) rapidement en surface pour augmenter le pH de surface pour favoriser la pousse des *Penicillium*.
- Afin d'ensemencer ses fromages en bleu, il est possible de prendre des fromages affinés ayant du bleu et de les tapoter au-dessus ou à proximité des fromages en cours d'affinage dans le hâloir, pour disperser les spores (« fumées » de moisissures), cette pratique est efficace si le *Geotrichum* n'est pas envahissant sur les fromages sinon plus de place pour le *Penicillium* !!!
- Vaporisation de bleu sur les fromages jusqu'à l'entrée au hâloir.
- Voir technique des glaçons de croûte ci-dessus.

Voir fiche « Croûtage « bleu » souhaité ».

Quelles sont les possibilités d'apport de flores d'affinage commerciales ?

Choix des ferments commerciaux

L'apport de flores d'affinage commerciales peut présenter différents avantages, notamment lorsque l'utilisation de lactosérum n'est plus possible (sanitaire, problème d'acidification), ou que ce dernier n'apporte pas suffisamment de flore pour obtenir le croûtage voulu.

D'autre part ce choix peut être fait par des fromagers qui souhaitent s'orienter sur un croûtage bien spécifique (cas de l'utilisation de *Penicillium album* pour avoir des fromages bleus en surface) ou sur des flores ayant des propriétés particulières (aspect, lipolyse, protéolyse, vitesse de développement). Le recours à des flores commerciales est aussi choisi par certains fromagers lorsqu'ils démarrent leurs toutes premières fabrications.

Certains genres et espèces de microorganismes décrits dans cette fiche peuvent être trouvés sous forme commerciale : levures (*Geotrichum*, *Candida*, *Kluyveromyces lactis*...), moisissures (*Penicillium album*, *P. camemberti*...) et bactéries (staphylocoque coagulase négative et bactéries corynéformes).

De nombreux fabricants ou revendeurs proposent des flores de surface, le choix étant parfois difficile lorsque l'offre est très importante (certains fabricants ont des centaines de souches différentes en collection). Le conseil apporté par le vendeur est alors très important.

Le producteur doit aussi avoir une idée précise de ce qu'il recherche :

- Quel aspect pour mon fromage ? quelle couleur ? par exemple pour le *Geotrichum* nous avons vu qu'il existe sous 3 formes (levuriforme, intermédiaire ou moisissure).
- Quelle vitesse de croissance ? paramètre important notamment pour la prévention de contaminants de surface comme le poil de chat ; attention cependant à éviter le défaut de croûte cartonnée.
- Quelles activités protéolytiques et lipolytiques ? le choix ne sera pas le même si le fromager souhaite faire du crémeux ou non.
- Sous quelle forme ? liquide ou lyophilisée ? attention ce paramètre va jouer sur la vitesse de croissance de la souche, et les modalités de préparation et d'utilisation du ferment d'affinage vont être différentes selon la forme.
- Quelle température de stockage et temps de conservation ?
- Quel conditionnement ? quel volume de lait transformé ? De nombreuses flores d'affinage existent dans des conditionnements permettant l'ensemencement de volumes de lait importants, donc pas toujours adaptés aux volumes transformés en fromagerie fermière.

- Pour quelle utilisation ? ensemencement dans le lait uniquement ? (le plus recommandé) pulvérisation ?
- Ai-je besoin d'une association de plusieurs flores d'affinage ? par exemple l'association d'une levure type *Candida utilis* permettant de faire remonter le pH en surface du fromage et aidant ainsi à la croissance du *Geotrichum*.

En prenant en compte l'ensemble de ces paramètres le producteur doit pouvoir être conseillé par le fabricant (ou vendeur) qui tâchera de trouver la solution la plus adaptée.

Si elle n'est pas fournie lors de la réception du colis, il est fortement conseillé de demander la fiche technique précisant les modalités d'utilisation et de conservation du ferment d'affinage.

Quelques recommandations sur la conservation et l'utilisation

- Conditions d'envoi : en général les cultures lyophilisées peuvent être livrées à température ambiante, alors que les autres types (poudre ou liquide) sont livrés dans des colis isothermes avec des plaques réfrigérantes (voire glace carbonique).
- A réception bien vérifier la DLUO.
- Les ferments d'affinage commerciaux ne se repiquent pas.
- Les ferments lyophilisés se conservent plus longtemps : en moyenne durant 6 à 24 mois si stockés à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (les mettre au congélateur dès réception) ou maximum 2 à 6 mois si cette température ne peut être respectée, et dans tous les cas jamais au-delà de $+4^{\circ}\text{C}$.
- Les ferments sous forme liquide se conservent moins longtemps : de 4 à 6 semaines à $+4^{\circ}\text{C}$, pas de congélation en l'état.
- Si à l'ouverture du sachet, le contenu de ce dernier n'est pas utilisé dans son intégralité, le refermer le plus hermétiquement possible et l'utiliser dans les plus brefs délais.
- Respecter les conditions de dosage, qui sont variables d'un fournisseur à l'autre.
- Si un changement de ferment est opéré, bien vérifier les doses à employer.
- Il semble intéressant d'apporter ces flores le plus tôt possible, dans le lait pour qu'elles aient le temps de se multiplier correctement et de gagner en puissance avant le démoulage. Ces levures ou moisissures seront apportées juste avant emprésurage. Attention toutefois, parfois un ensemencement dans le lait en levures en prématuration, peut engendrer une surproduction et entraîner des gonflements précoces.
- Même si l'ensemencement dans le lait est la technique la plus recommandée, la pulvérisation est possible (complémentaire) sur les fromages les plus jeunes possible, dès la fin du moulage, avec une préparation élaborée avec de l'eau bouillie refroidie, légèrement salée et préparée avant utilisation (attention pas de stockage long possible de la solution préparée !). Les fromages peuvent être vaporisés jusque dans le séchoir (pour le *Geotrichum*), ensuite l'hygrométrie de surface est faible et la pousse de ces micro-organismes sera mise à mal. Pour le *Penicillium* la pulvérisation reste possible jusque dans le hâloir.
- Pour la vaporisation sur les fromages : dans un peu d'eau stérile (du commerce ou bouillie) mettre un morceau de croûte (ou 1 dose de *Geotrichum* lyophilisé et dans ce cas-là ajouter aussi du sel (9 g/L)), laisser macérer de 30 minutes à 1 heure à température ambiante et utiliser la totalité TOUT DE SUITE en vaporisation 2 heures après ou avant le salage. NE PAS CONSERVER CETTE SOLUTION APRES USAGE (donc à renouveler si nécessaire le jour suivant).
- L'ensemencement des locaux par pulvérisation est également possible en fabrication-ressuyage, sur les moules, sur les tables, au séchoir. Pour les pièces suivantes il y a peu d'utilité à pulvériser car la flore du fromage doit déjà être bien implantée à l'arrivée au hâloir.

Comment bien redémarrer sa production après une période d'interruption ?

Le redémarrage des fabrications, après une période d'arrêt de production, et donc souvent après un nettoyage plus poussé de l'atelier (voire désinfection selon l'historique), doit s'accompagner d'un certain nombre de précautions qui permettront de reprendre dans les meilleures conditions possibles, en mettant toutes les chances de son côté pour notamment avoir des croûtages des fromages satisfaisants et s'affranchir des désagréments tels que le poil de chat (ou le bleu pour ceux qui ne le souhaitent pas, ou pas de manière trop précoce, en surface des fromages).

Ces précautions portent essentiellement sur l'ensemencement du lait, des locaux et la remise en route des dispositifs de chauffage, séchage et affinage.

- Vérifier son stock de ferments lactiques et d'affinage (qu'ils soient d'origine indigène ou commerciale) et si nécessaire commander les ferments manquants pour le redémarrage. Il est possible (mais pas conseillé) de se faire dépanner par un voisin en prenant soin de vérifier son historique en fabrication (accidents et sanitaire),
- Ensemencer dans le lait : soit du lactosérum ayant été congelé avec du lait dans une période sans accidents de fabrication ni problèmes sanitaires (voir fiche Centre Fromager de Carmejane), avec éventuellement des « glaçons de croûte », soit des ferments du commerce. Concernant le petit lait congelé avec du lait, il est préconisé de doubler la dose d'ensemencement au redémarrage,
- Ensemencer les pièces, en priorité la salle de fabrication, la salle de ressuyage (si salle dédiée), le séchoir et le hâloir. Le matériel (bacs de caillage, moules, claies) peut aussi êtreensemencé,
- Faire ou faire effectuer la maintenance et le nettoyage annuels avant de remettre les différents groupes et climatiseurs en marche (évaporateur dans les pièces climatisées, compresseurs et condenseurs à l'extérieur des locaux, voir fiche « entretien et nettoyage des équipements de climatisation »),
- Mettre suffisamment en avance en route le chauffage en salle de fabrication, le séchoir et un peu plus tardivement le hâloir, afin que les premières fabrications se déroulent dans des conditions optimales de température et d'hygrométrie. Vérifier les conditions des différentes pièces (température et hygrométrie).

Annexe 1 : Synthèse des microorganismes impliqués dans l'affinage des fromages lactiques et des composés dégagés (Gauzère, 2009 ; Le Mens, 2008)

Microflore de surface	Action	Composés aromatiques	Arômes/Flaveurs/Odeurs
Protéolyse des protéines et peptides et systèmes actifs sur les acides aminés:			
<i>Microcoques</i> <i>Penicillium</i> <i>Geotrichum</i>	Protéolyse des caséines	Peptides et acides aminés	
		Acide acétique, butyrique, diacetyl, acetoïne	Crème, beurre, amande, noisette
		Tyrosine, tryptophane, phenylethanol, phenol, phenylacetaldehyde	Rose, foin
	Acide isovalérique, isobutyrique, méthylbutanal	Malte, vieux fromage, carné, cuir	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Transamination	Methional Methionol	Pomme de terre cuite Choux,
<i>Microcoques</i> <i>G.candidum</i>	Décarboxylation des acides aminés	Amines, CO ₂ , NH ₃	
<i>Penicillium</i>	Protéolyse des caséines	Peptides	Amertume
	Désamination des acides aminés	Acides cétoniques, NH ₃	
<i>G.candidum</i>	Oxydation du méthane thiol	Diméthyldisulfure Diméthyltrisulfure	ail, oignon coing, asperge
Lipolyse des matières grasses et systèmes actifs sur les acides gras:			
Levures, Moisissures, <i>Microcoques</i> , <i>Pseudomonas</i>	Estérification des Acides Gras Libres	Acides gras à courtes chaînes	
		Esters	Arôme fruité, floral
<i>Geotrichum</i> Moisissures <i>Pseudomonas</i>	Lipolyse des matières grasses	Acides gras Libres	
		Acide 4, éthyl octanoïque	Chèvre
		Acide butyrique	Rance
		Acide octanoïque	Savon
		Acide hexanoïque	Piquant
			Amer
Moisissures et <i>G.candidum</i>	β-oxydation des acides gras	Méthylcétones	Champignon, moisi
Moisissures et <i>G.candidum</i>	Réduction des méthylcétones	Alcools secondaires	Moisi, fruité
Fermentation des sucres :			
Levures Moisissures	Dégradation des lactates et de l'acide lactique dans le cycle de krebs	CO ₂ et H ₂ O	
Levures	Dégradation du lactose par voie pentose phosphate	Acide lactique	
		éthanol	
		CO ₂	
		Acide acétique	Vinaigre
		Acide Formique	
		Acide Succinique	
		2,3 butannediol	
Microcoques Moisissures	Dégradation du lactose par Glycolyse	CO ₂ et H ₂ O	

Références bibliographiques

Publications :

- Aumasson A., 2013. Connaissance de l'affinage des fromages de chèvre fermiers lactiques. Locaux, pratiques et types de fromages affinés à la ferme. Mise au point d'enquêtes en fermes. Rapport de stage de fin d'étude ISARA-Institut de l'Elevage, 86 pages.
- Barral J., Goncalves A., 2008. Acquisition de connaissances sur les rôles de certaines bactéries isolées de fromages au lait cru de chèvre et d'environnement laitier. Actilait, 90 pages.
- Bockelmann W., Portius S., Lick S., Heller K.J., 1999. Sporulation of *Penicillium camemberti* in submerged batch culture. Syst Appl Microbiol.; 22(3) : 479-85.
- Boutrou R., Guéguen M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. Int J Food Microbiol, 25, 102(1) : 1-20.
- Brennan N.M., Ward A.C., Beresford T.P., Fox P. F., Goodfellow M., Cogan T.M., 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. Appl. and Environ. Microbiol. 68 (2): 820-830.
- Centre Fromager de Carmejjane, 1996. Conservation du lactosérum par congélation. 4 pages.
- Cerning J., Gripon J.C., Lamberet G., Lenoir J., 1987. Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. Lait 67 : 3-39.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J. C., Lamberet, G, Lenoir J., 1997a. La biochimie de l'affinage. In Le fromage, p. 86-153. Edited by A. Eck & J. C. Gillis. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.
- Cholet O., 2006. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Life Science. INAPG (AgroParisTech).
- Collectif, 2012. Clé USB et site internet d'accès restreint « Outil d'amélioration technologique et sensorielle des produits laitiers fermiers ». Coord. Cécile Laithier et Agathe Bonnes (Institut de l'Elevage) sous l'égide de la FNEC/FNPL, édition Institut de l'Elevage.
- Corbiere Morot-Bizot S., 2006. Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 144 pages.
- Das S., Holland R., Crow V. L., Bennett R. J., Manderson G. J., 2005. Effect of yeast and bacterial adjuncts on the CLA content and flavour of a washed-curd, dry-salted cheese. Int. Dairy Journal. 15: 807-815.
- Demarigny Y., Berger C., Desmasures N., Guéguen M., Spinnler H., 2000. Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. Journal of Dairy Research, Vol 67 (3) : 371-380.
- De Roissart et Luquet, 1994. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Editions Loriga, Uriage. 1 220 pages.
- Desmazeaud M.J., Vassal L., 1979. Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles. Rôle au cours de l'affinage des fromages. Lait, 59 : 327-344.

- Dieuleveux V., Van Der Pyl D., Chataud J., Gueguen M., 1998. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 800-803.
- Dieuleveux V., Lemarinier S., Guéguen M., 1998. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int J Food Microbiol.*, 40(3) : 177-83.
- Fickers P., Marty A., Nicaud J.M., 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Adv.* 29(6) : 632-44.
- Gaborit P., Raynal-Ljutovac K., 2008. Flavor of goat milk cheese characterized by a rapid and representative tool. 5th IDF Symposium on Cheese Ripening, Bern. 1 page.
- Gaborit P., Menard A., Morgan F., 2001. Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses. *International Dairy Journal*, 11 : 315-325.
- Gaüzere Y., 2009. Les flores de surface et d'affinage. Intervention aux journées techniques de l'ENILBIO Poligny « 20 ans de formation et d'accompagnement au service des producteurs fromagers fermiers » du 21 et 22 avril 2009. 46 diapositives.
- Giraffa G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol*, 88(2-3) : 215-222.
- Gock M.A., Hocking A.D., Pitt J.I., Poulos P.G., 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int J Food Microbiol.* 81(1) : 11-9.
- Guéguen et Lenoir, 1975. Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. NOTE COMPLEMENTAIRE. *Le Lait*, 1975, 55 (549 550), p.621- 629.
- Guéguen M., Jacquet J., 1982. Etudes sur les caractères culturels et la morphologie de *Geotrichum candidum*. *Le Lait* 62 (621 622) : 625-644.
- Hermier J., Lenoir J., Weber F., 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, 568 pages.
- Institut de l'Elevage, FNEC, PEP Caprins RA, Centre Fromager de Carmejane, CDEO, Languedoc Roussillon Elevage, CTFC, ENILBIO Poligny, ITFF, Université Claude Bernard Lyon 1, Office de l'Elevage, 2007. CD rom Guide d'appui technique sur les accidents de fromagerie à la ferme, 2ème version. Edition Technipel, Paris.
- Irlinger F., Morvan A., El Solh N., Bergere J.L., 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 20 : 319-328.
- Kagkli D.M., Tâche R., Cogan T.M., Hill C., Casaregola S., Bonnarne P., 2006. *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(2) : 434-42.
- Karam N.E., Dellali A., Zadi-Karam H., 2012. Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. Journées 3R, Institut de l'Elevage-INRA, p.19.
- Laithier C., Raynaud S., Bonnes A., Doutart E., Lopez C., Dumonthier P., Morge S., Barral J., Reynaud C., Lefrileux Y., Gaüzère Y., Rossignol L., Allut G., Pétrier M., Leroux V., Demarigny Y., Tormo H., Lefier D., Beuvier E., Callon C., Montel M.C., Lesty M., Anglade P., Durand G., Ray J.C., Chabanon A., Blanchard F., Lesty M., Le Ravallec P., 2011. Maîtrise de l'acidification en technologie lactique fermière. Guide d'appui technique, fiches techniques et kit de formation producteurs. Clé USB Institut de l'Elevage.

- Laithier C., avec l'appui des partenaires du programme, 2006. « Guide d'appui technique sur les accidents de fromagerie suite : défauts des lainures et accident du Bleu. Premiers résultats ». Edition Technipel, collection résultats. Compte rendu 15 06 38 001, 72 pages.
- Leclercq-Perlat M.N., Corrieu G., Spinnler H.E., 2004. Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Dairy science*, 87 : 1545-1550.
- Le Mens P., 2008. La biogénèse des arômes pendant l'affinage des fromages. *Fureur de vivre* [en ligne].
- Lefrileux Y., Picque D., Mirade P.S., Gaüzere Y., Leclercq-Perlat M.N., Guillemin H., Saint-Eve A., Auburger J.M., Le Jan E., Dorléac A., Morge S., Pradal M.J., Oliveira E., Birkner J., Doutart E., Alaoui-Sosse L., Lopez C., Raynaud S., 2016. Expérimentations sur l'affinage de fromages lactiques fermiers au lait de chèvre. Action 2 du projet QUALITE DES FROMAGES FERMIERS LACTIQUES : LOCAUX ET MAITRISE DE L'AFFINAGE (LACTAFF). Rapport de fin d'étude collection résultats de l'Institut de l'Elevage. *En cours de publication*.
- Lenoir J., Lamberet G., Schmidt J.L., 1983. L'élaboration d'un fromage : l'exemple du camembert. *Pour La Science*, 69 : 30-42.
- Mahaut M., Jeantet R., Brûlé G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. Editions Tec&Doc, 194 pages.
- Millet J., 1998. Les agents d'affinage. Support de formation – ENILV La Roche sur Foron.
- Molimard P., Spinnler H.E., 1996. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, Volume 79, Issue 2 : 169–184.
- Morel G., 2013. La levure *Geotrichum candidum* : taxonomie, biodiversité et génome. Sciences agricoles. Thèse de l'Université Paris Sud - Paris XI, 195 pages.
- Mounier J., Monnet C., Vallaeys T., Arditi R., Sarthou A.S., 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (1) : 172-181. .
- Nunez J.A., Chavarri F.J., Nunez M., 1984. Psychrotrophic bacterial flora of raw ewes' milk, with particular reference to Gram-negative rods. *J. Appl. Bacteriol.*, 57 : 23-29.
- Nahabieh F., Schmidt J.L., 1990. Contribution à l'étude de la flore levure de quelques grands types de fromages de chèvre. *Lait*, 70 : 325-343.
- PEP caprin Rhône-Alpes, 2011. Évaluer l'ambiance des locaux et définir l'origine des contaminations avec le test St Môret®. Fiche D110901. 4 pages.
- Profession fromager, 2014. Mieux gérer l'affinage des pâtes lactiques, des pâtes molles et des pâtes pressées non cuites. Profession fromager, journée technique du 17 juin 2014, diaporama, 165 diapositives.
- Raynal K., 2002. Les flores de surface. Bulletin l'Egide N°29-décembre 2002.CRDC. 2 pages.
- Raynaud S., Morge S., Pétrier M., Allut G., Barral J., Enjalbert V., Reynaud C., Michel A., Fatet E., Chabanon A., Teinturier M., Gaüzere Y., Picque D., Guillemin H., Doutart E., Alaoui-Sosse L., Mirade P.S., Jean P., Lopez C., Blanchin J.Y., Laithier C., Leroux V., Aumasson A., Montoya P., 2016. Caractérisation des conduites d'affinage à la ferme et étude des liens avec les paramètres d'ambiance des locaux et la qualité des fromages. Action 1 du projet QUALITE DES FROMAGES FERMIERS LACTIQUES : LOCAUX ET MAITRISE DE L'AFFINAGE (LACTAFF). Rapport de fin d'étude collection résultats de l'Institut de l'Elevage. *En cours de publication*.

- RESEAU FROMAGES DE TERROIRS, 2011. Microflore du lait cru -Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. Ouvrage collectif coordonné par Cécile Laithier (Institut de l'Élevage). Édition CNAOL-Réseau Fromages de Terroirs. 130 pages.
- Slavina V., 2008, Maitrise des fabrications fromagères fermières : comparaison d'exploitations cas et témoins. Rapport de stage IUT Digne les Bains – Actilait, 42 pages.
- Soullignac, L. 1995. Propriétés des levures fromagères: Influence des substrats carbonés utilisés sur leurs capacités à désacidifier les caillés et à produire des composés d'arôme. Ph.D. Thesis, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris-Grignon, France.
- Tormo H., Ali Haimoud-Lekhal D., Lopez C., 2007. Flore microbienne des laits crus de chèvre destinés à la transformation fromagère et pratiques des producteurs. 14èmes Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Élevage, INRA, Paris, p. 87-90.
- Vadillo S., M. Jesus PAYA, M. Teresa CUTULI, . Mycoflora of milk after several types of pasteurization. Le Lait, 1987, 67 (2) : 265-273.
- Van den Tempel, T., Nielsen, M.S., 2000. Effects of atmospheric conditions, NaCl, pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. Int. J. Food Microbiol. 57 : 193–199.

Collection : L'Essentiel

Equipe de rédaction : Julie BARRAL (Languedoc Roussillon Elevage puis CA 34), Claire BÄRTSCHI, Yves GAÜZERE (ENILBIO Poligny), Patrick ANGLADE (CFF Patrick Anglade), Guillemette ALLUT (CRAB-Centre Fromager de Bourgogne), Coralys ROBERT (Institut de l'Élevage)

Relecteurs : Marie-Noëlle LECLERQ-PERLAT et Daniel PICQUE (INRA), Antoine MICHEL, Catherine REYNAUD (ACTALIA Centre de Carmejjane), Agnès CHABANON, Mélissa TEINTURIER (FRESYCA), Cécile LAITHIER, Yves LEFRILEUX (Institut de l'Élevage), Alexane DORLÉAC (station caprine expérimentale du Pradel EPLEFPA)

Responsables professionnels du programme : Frédéric BLANCHARD et Marc LESTY (FNEC), Eric CORNILLON (PEP Caprins Rhône-Alpes), Marc DONNEAUD (MRE PACA)

Coordination et rédaction : Marion PETRIER (CA 18 – CTFC), Sylvie MORGE (PEP Caprins Rhône-Alpes), Sabrina RAYNAUD (Institut de l'Élevage)

Mise en page : Isabelle GUIGUE (Institut de l'Élevage)

Avril 2016 - Réf. Idéle : 00 16 403 009

Dépôt légal : 2^{ème} trimestre 2016 © Tous droits réservés à l'Institut de l'Élevage

