

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE

**MICROBIOLOGIQUE DE LA MATURATION**

DES

**FROMAGES MOUS**

PAR

**Émile MARCHAL**

INGÉNIEUR AGRICOLE

---



## CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE

### MICROBIOLOGIQUE DE LA MATURATION DES FROMAGES MOUS

---

Depuis que les recherches fondamentales de Duclaux ont fait connaître le rôle que jouent les microbes dans la maturation des fromages, on ne s'est guère préoccupé d'étudier la flore microbienne spéciale de chacun de ces derniers.

Seules, quelques variétés de fromages ont fait l'objet d'études suivies : l'Emmenthal et le Gruyère de la part de Schaffer et Bondzynski (1), d'Adametz (2), de de Freudenreich (3) et, plus récemment, de Baumann (4); le fromage d'Edam, de la part de Beyerinck (5).

Hormis quelques observations de Weigmann, les fromages à pâte molle et peu pressée n'ont guère été jusqu'ici étudiés à ce point de vue, bien que, cependant, ce soit surtout chez ces derniers que la connaissance des actions microbiennes qui s'effectuent au cours de la maturation peut éclairer et guider le fabricant.

(1) SCHAFFER et BONDZYNSKI. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz*, I, p. 47, et II, p. 52.

(2) ADAMETZ. *Landwirtschaftliche Jahrbücher*, XVIII, 2, p. 228.

(3) DE FREUDENREICH. *Recherches sur le rôle des bactéries dans la maturation du fromage de l'Emmenthal*. *Annales de Micrographie*, t. II, p. 257.

(4) P. BAUMANN. *Beiträge zur Erforschung der Käsereifung*. Inaug. Dissert. Königsberg, 1895.

(5) BEYERINCK. *Centralblatt f. Bakter. u. Paras.* Bd. VI, p. 45, 1889.

Les recherches consignées dans le présent travail ont porté sur deux variétés de fromages mous dont la fabrication est très répandue en Belgique : le fromage de Herve ou de Limbourg (Baksteinkäse des provinces rhénanes), et le fromage appelé « Casette », « Crasstoffé », « Fort fromage », etc., dont la préparation, assez variable d'ailleurs dans ses détails, est répandue dans différentes régions du pays.

### Fromage de Herve.

Cette variété appartient à la classe des fromages à pâte molle et peu pressée, chez lesquels la maturation est poussée très loin et où il se produit, aux dépens de la caséine, des quantités relativement élevées d'ammoniaque et d'acide gras volatils qui communiquent au produit son odeur et son goût forts et caractéristiques.

*Flore microbienne.* — Pour isoler les multiples espèces microbiennes qui peuplent les fromages, je me suis servi concurremment de la séparation sur plaques de gélatine et de la méthode des dilutions. Les résultats ont été presque toujours concordants.

Les hôtes des fromages se développent, en effet, pour la plupart sur la gélatine riche au bouillon et alcaline, moins bien sur le sérum de lait gélatinisé.

Beaucoup de bactéries des fromages, notamment celles qui appartiennent au groupe des ferments lactiques, ne présentent sur la gélatine qu'un développement très limité; leurs colonies n'y deviennent apparentes qu'après un temps souvent très long, huit, dix jours et parfois plus. Les espèces peptonisantes, au contraire, parmi lesquelles se trouvent les agents les plus énergiques

de la maturation des fromages, croissent très rapidement sur les milieux solides et forment sur la gélatine des colonies liquéfiantes et envahissantes.

La proportion des colonies liquéfiantes et des non liquéfiantes varie beaucoup d'après le moment de la maturation. Au début de cette dernière, les espèces non peptonisantes prédominent ; à la fin du processus, l'inverse se constate et il arrive un moment où il n'existe plus que des espèces liquéfiantes.

Quoiqu'il en soit, dans un fromage de Limbourg, de maturation modérée, on rencontre normalement quatre espèces microbiennes :

- 1° Une bactérie liquéfiante en très grande quantité ;
- 2° Une bactérie non liquéfiante ;
- 3° Une levure ;
- 4° Superficiellement de l'*Oospora lactis*.

Bien que je n'aie pu constater la constance absolue d'aucune forme bactérienne dans les nombreux échantillons de fromage examinés, j'ai observé dans la grande majorité, comme bactérie liquéfiante prédominante, un bacille court qui sera désigné dans la suite de cette étude sous le nom de Bacille  $\alpha$ .

Parmi les espèces non liquéfiantes, la plus fréquente, à côté du ferment lactique typique, est un long bacille immobile, auquel nous attribuerons la dénomination de Bacille  $\beta$ .

La levure la plus constante est un *Saccharomyces* à cellules petites, rondes, que nous étudierons sous le nom de Levure  $\alpha$ .

Après avoir appris à connaître ces divers organismes dans leurs caractères morphologiques et surtout dans leurs propriétés physiologiques, nous verrons comment

leurs activités spécifiques interviennent dans la maturation du fromage.

**Bacille  $\alpha$  du fromage de Herve.**

*Caractères microscopiques.* — Bâtonnets grêles, libres, plus rarement (en milieu liquide) réunis par deux, trois, très mobiles; 2 — 3 = 0,5 — 0,7  $\mu$ . La formation de spores n'a pas été observée.

*Caractères macroscopiques.* — Culture sur plaques de gélatine au bouillon, alcaline.

La culture sur gélatine rappelle beaucoup celle du *Bacillus subtilis*.

Ce sont, à la surface de la gelée, de petits disques arrondis, à centre jaunâtre, à bords sinueux. La liquéfaction de ces colonies, rapidement envahissantes, commence par le centre et se propage ensuite vers la périphérie.

En piqûre, le développement est faible le long de la strie d'inoculation, mais, à la surface, s'étend une colonie large qui liquéfie bientôt la couche superficielle de la gélatine.

*Culture dans le lait.* — Dans le lait, à l'étuve à 35°, on n'observe aucun changement durant les deux premiers jours; à la fin du deuxième, le plus souvent le troisième, la caséine est précipitée et forme un coagulum peu compact et à grumeaux. La redissolution de ce dernier est très énergique et très rapide; en même temps, le liquide prend une teinte jaune qui va en s'accroissant tout en virant au verdâtre. La matière grasse inattaquée surnage et forme au-dessus du sérum une couche beaucoup plus claire.

La culture exhale une odeur forte, à la fois butyrique

et ammoniacale, rappelant beaucoup celle du fromage de Herve bien mûr.

### Propriétés physiologiques.

L'action du Bacille  $\alpha$ , sur les éléments du lait, est complexe.

Pour la mettre en relief, 250<sup>cm</sup><sup>3</sup> de lait, stérilisés à 120°, ont étéensemencés de microbes et placés au thermostat à 35°. Après cinq jours, époque où la caséine s'était en grande partie redissoute, le volume ayant été ramené à 250<sup>cm</sup><sup>3</sup>, l'analyse en a été faite et comparée à la composition du lait primitif stérilisé. Voici les chiffres obtenus :

ÉLÉMENTS	Lait primitif : p. 100	Lait fermenté : p. 100
Eau . . . . .	87,44	88,59
Matière sèche . . . . .	12,56	11,41
Sucre . . . . .	5,08	5,1
Caséine totale . . . . .	3,38	2,25
Caséine insoluble . . . . .	3,35	0,40
Caséine soluble . . . . .	0,03	1,74
Matière grasse . . . . .	3,40	3,36
Cendres totales . . . . .	0,69	0,70
Ammoniaque . . . . .	"	0,07
Acide butyrique . . . . .	"	0,03

*Discussion.* — Il est facile de déduire de ce tableau les propriétés physiologiques les plus saillantes du Bacille  $\alpha$ .

1° On remarque, tout d'abord, que la teneur en extrait sec a diminué.

2° Cette perte de matière sèche a porté uniquement sur la caséine dont une partie a été transformée en composés volatils : ammoniaque, acides organiques, acide carbonique.

3° Le sucre de lait est resté inattaqué.

4° Il en est de même de la matière grasse; le très léger déficit constaté est à mettre sur le compte d'une saponification partielle produite sous l'influence de l'ammoniaque formée.

5° La caséine insoluble a été presque intégralement transformée en caséine soluble, ou caséone, sous l'influence de la caséase sécrétée par le microbe.

Il est à remarquer cependant que l'on a compris, sous le nom de caséine soluble, tout le résidu sec du lait fermenté, filtré sur porcelaine, diminué du sucre et des cendres solubles; il renferme, à côté de la caséone, de petites quantités de leucine, tyrosine, sels ammoniacaux, etc.

6° Deux autres produits nouveaux ont pris naissance aux dépens de la caséine primitive : l'ammoniaque, à l'état de carbonate et de sels d'acides gras, et l'acide butyrique, accompagné de petites quantités d'acide valérianique et d'acide acétique.

Comme on le voit, le Bacille  $\alpha$  du fromage de Herve appartient au groupe physiologique des *Tyrothrix* de Duclaux. Comme ces derniers, il sécrète deux zymases qui agissent sur la caséine, une présure qui précipite la matière azotée du lait, et une caséase qui redissout le coagulum formé.

C'est un agent énergique de la maturation des fromages.

Il est aérobie, sensible à une réaction acide du milieu qui entrave son développement.

#### Bacille $\beta$ du fromage de Herve.

*Caractères microscopiques.* — Bacilles longs, très grêles,  $3,7 = 0,5 \mu$ , à extrémités légèrement arrondies,



parfois réunis en courtes chaînettes souvent brisées, immobiles.

*Caractères macroscopiques. Culture sur gélatine en plaques.* — Le Bacille  $\beta$  forme sur gélatine alcaline neutre ou légèrement acide de petites colonies jaunâtres, rondes, à bord net dans la profondeur de la gelée, un peu étalées à la surface de cette dernière. Il n'y a pas de liquéfaction de la gélatine. Le développement ultérieur de ces colonies est très lent et très limité.

En piqûre, il se forme un faible enduit le long de la strie d'inoculation et une petite colonie superficielle.

*Culture dans le lait.* — Le lait,ensemencé à l'aide du Bacille  $\beta$ , prend, dès le second jour, à 33°, en un coagulum compacte dont se sépare un sérum clair.

La culture conserve désormais cet aspect ; elle exhale un délicat arôme de bon beurre qui, après quelque temps, perd de sa finesse et se transforme en une odeur butyrique.

#### Propriétés physiologiques.

Le tableau suivant indique la composition d'un lait ayant nourri le Bacille  $\beta$  pendant cinq jours, à 33° :

ÉLÉMENTS	Lait primitif.	Lait fermenté.
Eau . . . . .	87,44	88,75
Matière sèche . . . . .	12,56	11,25
Sucre . . . . .	5,08	3,92
Caséine totale . . . . .	3,38	3,26
Caséine soluble . . . . .	3,35	3,20
Caséine insoluble . . . . .	0,03	0,06
Cendres totales . . . . .	0,69	0,71
Cendres solubles . . . . .	0,31	0,33
Cendres insolubles . . . . .	0,39	0,37
Matière grasse . . . . .	3,40	3,39
Acide lactique . . . . .	"	0,97
Acides gras volatils (butyrique, acétique) . . . . .	"	0,13

Comme on le voit, sous l'influence du Bacille  $\beta$ , les éléments du lait subissent les modifications suivantes :

1° Le sucre de lait est en partie transformé en acide lactique ; nous verrons tout à l'heure que l'acidité produite paralyse l'action du microbe et empêche la réaction d'être complète ;

2° La matière grasse reste inaltérée ;

3° La caséine (rendue insoluble en totalité par la stérilisation) passe de l'état de suspension à l'état précipité. L'augmentation de caséine soluble est insignifiante et rentre dans les limites d'erreurs des dosages.

Étudions maintenant d'un peu plus près la fermentation lactique produite par le Bacille  $\beta$ .

Si l'on ensemence, de ce microbe, du sérum (1) additionné de craie pulvérisée, on observe, dès le second jour, à 53°, une active fermentation.

Des bulles de gaz s'élèvent nombreuses du dépôt alcalino-terreux et la culture prend l'aspect d'une fermentation alcoolique en pleine activité.

Voici les quantités de sucre disparu et d'acide lactique produit dans un petit lait dosant 5,3 p. 100 de lactose :

	Sucre disparu par litre.	Acide lactique produit par litre.
Après 1 jour . . . . .	1,5 gr.	0,23 gr.
— 2 jours . . . . .	12,7 —	7,6 —
— 3 — . . . . .	23,6 —	13,5 —
— 5 — . . . . .	36,3 —	24,8 —
— 8 — . . . . .	48,3 —	37,5 —
— 10 — . . . . .	50,1 —	42,2 —
— 15 — . . . . .	51,0 —	42,9 —

(1) Obtenu en précipitant, par la présure, du lait écrémé à la turbine centrifuge.

Les sucres suivants sont fermentescibles : saccharose, dextrose, lactose, maltose ; le Bacille  $\beta$  attaque, bien que moins énergiquement, l'amidon et la dextrine, mais il est sans action sur l'inuline.

L'acide lactique produit, aux dépens de la lactose, par le Bacille  $\beta$ , est inactif. Les minutieuses et récentes recherches de Kayser (1) ont montré que, sous ce rapport, les aptitudes des divers ferments lactiques sont très différentes ; les uns donnant de l'acide dextrogyre, les autres du lévogyre, d'autres enfin de l'acide inactif.

A côté de l'acide lactique, la Bacille  $\beta$  donne naissance, en quantité très notable, à de l'acide acétique et à de petites quantités d'acide formique et d'acides gras volatils supérieurs.

#### Levure $\alpha$ du fromage de Herve.

*Caractères microscopiques.* — Cellules rondes, petites, 3-4,5  $\mu$  diam., très bourgeonnantes ; les cellules-filles restent volontiers fixées aux cellules-mères et, proliférant à leur tour, constituent des masses compactes, denses, formées d'innombrables globules (fig. 1 de la planche).

#### *Caractères macroscopiques.*

*Colonies sur plaque.* — Elles sont largement étalées à la surface de la gélatine, à contours irréguliers, blanches, céracées, peu proéminantes.

En piqûre sur gélatine, il se forme, le long du trait d'inoculation, un enduit blanc en entonnoir très aigu et

(1) KAYSER. *Contribution à l'étude de la fermentation lactique.* (Ann. de l'Inst. Pasteur, 1894.)

s'étalant à la surface en une colonie large, irrégulière. On n'observe pas de dégagement gazeux ni de liquéfaction.

*Culture dans le lait.* — La culture de ce microbe dans le lait ne révèle aucun phénomène bien caractéristique. La croissance de la levure n'y est d'ailleurs pas très luxuriante; le lait ne change pas d'aspect et ne fait qu'acquérir, après quelque temps, une coloration légèrement jaunâtre.

#### Propriétés physiologiques.

Voici l'analyse d'un lait abandonné pendant dix jours, à 33°, à l'action de la Levure  $\alpha$ .

ÉLÉMENTS	Lait primitif.	Lait fermenté.
Eau . . . . .	86,7	88,80
Matière sèche . . . . .	13,3	11,20
Sucre . . . . .	4,9	3,07
Caséine totale . . . . .	4,0	3,80
Caséine insoluble . . . . .	4,0	3,28
Caséine soluble . . . . .	traces	0,52
Matière grasse . . . . .	3,65	3,60
Cendres . . . . .	0,75	0,73
Ammoniaque . . . . .	"	traces
Alcool . . . . .	"	0,6
Acide butyrique . . . . .	"	traces
Réaction . . . . .	"	Faiblement acide.

La comparaison de ces chiffres montre que cette levure n'a d'action bien énergique sur aucun des éléments du lait.

Le microbe jouit vis-à-vis de la caséine d'un faible pouvoir peptonisant. C'est sur le sucre qu'il agit le plus activement, une partie de ce dernier est transformé en alcool.

Cette levure constitue un ferment alcoolique faible des sucres suivants : saccharose, maltose, dextrose,

lévulose; elle est inactive à l'égard de l'amidon, de la dextrine, de la mannite, etc.

Il est assez étrange qu'une espèce aussi indifférente vis-à-vis des éléments du lait constitue un hôte normal du fromage de Herve.

J'ai d'ailleurs extrait de différentes variétés de fromage, notamment du Gruyère et de l'Emmenthal, d'autres formes bourgeonnantes assez variées au point de vue morphologique, mais également incapables de faire fermenter la lactose.

Il semble donc que les fromages sains ne renferment pas de levures alcooliques du sucre de lait; l'apparition de ces dernières s'accompagne d'ordinaire d'une fermentation anormale, de boursoufflements.

C'est ce que j'ai constaté pour un échantillon de fromage de Herve gonflé, duquel j'ai isolé un ferment alcoolique énergétique de la lactose, dont il sera parlé plus loin sous le nom de Levure  $\beta$ .

Les ferments alcooliques du sucre de lait sont relativement très rares dans la nature; s'il en était autrement, on verrait se produire beaucoup plus souvent les accidents de fabrication qu'ils déterminent, non seulement en fromagerie, mais aussi dans la préparation du beurre.

Duclaux a signalé, il y a quelques années déjà, un cas de fermentation alcoolique spontanée de la crème.

Un accident analogue s'est présenté récemment dans une ferme des environs de Gembloux. La crème y devenait le siège d'une fermentation très active, décelée par un abondant dégagement de gaz carbonique; la fabrication du beurre était, par ce fait, très sérieusement compromise.

J'isolai de cette crème une levure s'éloignant beau-

coup, par ses caractères morphologiques, des ferments alcooliques de la lactose, cependant déjà nombreux, décrits jusqu'à ce jour par Pirotta et Riboni<sup>(1)</sup>, Duclaux<sup>(2)</sup>, Adametz<sup>(3)</sup>, Kayser<sup>(4)</sup>, Beyerinck<sup>(5)</sup>, Grotenfeld<sup>(6)</sup> et Bochicchio<sup>(7)</sup>.

- Cette curieuse espèce est étudiée plus loin sous la dénomination de Levure  $\gamma$  de la crème.

Une stérilisation soignée des ustensiles de la laiterie eut rapidement raison de cet accident heureusement extrêmement rare dans la pratique laitière.

#### Levure $\beta$ du fromage de Herve gonflé.

*Caractères microscopiques.* — Cellules dissociées, rarement groupées, même dans les cultures jeunes, ovales,  $3 - 5 = 2,5 - 4 \mu$  (fig. 2 de la planche).

*Caractères macroscopiques.* — Culture sur plaque. Forme sur plaque de gélatine au moût de bière de petites colonies rondes, à contour très net, peu proéminantes et ne s'étendant guère plus que la levure de bière.

En piqûre, la culture est faible, en entonnoir très allongé le long du trait d'inoculation et s'épanouit superficiellement en une colonie peu étendue.

*Culture dans le lait.* — Elle est assez caractéristique.

(1) PIROTTA et RIBONI. *Studii sul latte*, Archiv. del labor. di botan. crittogamica di Pavia, vol. II et III, 1879, p. 301.

(2) DUCLAUX. *Fermentation alcoolique du lactose*. Annales de l'Institut Pasteur, t. I, p. 373.

(3) ADAMETZ. *Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasit*, t. V, 1889, p. 116.

(4) KAYSER. *Contribution à l'étude physiologique des levures alcooliques du lactose*, Ann. de l'Inst. Pasteur, t. V, p. 295.

(5) BEYERINCK. *Die Lactase, ein neues Enzym*, *Centralb. f. Bakt. u. Paras.*, t. VI, p. 44.

(6) GROTENFELD. *Forschrit. d. Med.* 1889, t. IV.

(7) BOCHICCHIO. *Contribution à l'étude des fermentations de la lactose*, *Ann. de Microg.* t. VI, p. 165.

Après deux jours, à 33°, la caséine, en partie précipitée, se présente sous l'aspect de grumeaux peu volumineux. Des bulles gazeuses soulèvent la couche de crème superficielle.

Voici l'analyse d'un lait fermenté, pendant huit jours, par la Levure  $\beta$ .

ÉLÉMENTS	Lait primitif.	Lait fermenté.
Eau . . . . .	86,7	91,73
Matière sèche. . . . .	13,3	8,27
Sucre. . . . .	4,9	0,22
Matière grasse . . . . .	3,65	3,60
Caséine totale. . . . .	4,0	3,70
Caséine soluble . . . . .	traces	0,52
Caséine insoluble . . . . .	4,0	3,18
Cendres . . . . .	0,75	0,75
Alcool . . . . .	"	2,1
Ammoniaque . . . . .	"	traces
Acide butyrique . . . . .	"	traces

Comme on le voit, la Levure  $\beta$  agit très énergiquement sur le sucre de lait.

Voici les quantités de sucre disparu et d'alcool formé dans du petit lait dosant primitivement 5,06 p. 100 de lactose, à la température de 25°.

APRÈS	Sucre dans la liqueur p. 100 en poids.	Sucre disparu p. 100 en poids.	Alcool produit p. 100 en volume (1).
1 jour . . . . .	5,00	0,06	0,00
2 jours . . . . .	4,42	0,64	0,3
4 — . . . . .	3,1	1,96	1,0
5 — . . . . .	1,57	3,49	2,0
8 — . . . . .	0,00	5,06	2,5

(1) Les dosages d'alcool ont été effectués à l'aide du compte-gouttes de Duclaux; les résultats sont probablement un peu forcés par la présence de petites quantités d'éthers dans le distillat.

La Levure  $\beta$  fait aussi fermenter énergiquement les sucres suivants :

Saccharose, lactose intervertie, dextrose, tandis qu'elle laisse inattaquée les gommés, l'amidon, l'inuline, la dextrine, la mannite, etc.

Beyerinck attribue aux deux ferments alcooliques de la lactose qu'il a étudiés, les *Saccharomyces Kephyr* et *tyrocola*, une zymase spéciale capable d'intervertir la lactose en sucres directement fermentescibles et à laquelle il a donné le nom de lactase.

Mes recherches, pour démontrer l'existence d'une telle zymase, dans les cultures de la Levure  $\beta$ , m'ont donné jusqu'ici des résultats négatifs.

Le précipité produit par l'alcool dans le sérum fermenté par cette levure et filtré sur porcelaine ne semble jouir d'aucune propriété zymotique. Additionné à une solution de lactose, il n'en modifie pas sensiblement le pouvoir rotatoire et ne la rend pas fermentescible pour la levure de bière. Toutefois, je continue mes expériences sur ce sujet en variant les conditions.

#### Levure $\gamma$ .

*Caractères microscopiques.* — Par ses caractères morphologiques, la Levure  $\gamma$  de la crème se différencie très nettement des précédentes et, d'ailleurs de toutes les levures de la lactose connues; elle se rapproche assez bien du *Saccharomyces Mycoderma*.

Cellules (conidies) très diverses, généralement cylindriques, allongées, droites ou courbes, de 3 à 4  $\mu$  d'épaisseur, constituant dans leur ensemble une masse filamenteuse dense et très ramifiée. En milieu liquide,



les cellules moins longues sont souvent ovales ou elliptiques et mesurent de 3 à 7  $\mu$  de long sur 3 à 5,5  $\mu$  de large (fig. 3<sup>a</sup>, 3<sup>b</sup>, 3<sup>c</sup> de la planche).

*Affinités.* — Malgré sa grande analogie morphologique avec le *Saccharomyces Mycoderma*, on ne peut identifier la Levure  $\gamma$  avec cette espèce. Elle ne forme pas à la surface des liquides la pellicule caractéristique de la « fleur de vin » et, de plus, son action sur les sucres est toute différente; elle ne produit pas, en effet, d'acide acétique aux dépens de ces derniers.

*Caractères macroscopiques. Culture sur gélatine.* — Colonies grandes, tantôt étalées et aplaties, tantôt prédominant hors de la gélatine en une masse blanche, céracée, cylindrique ou conique, pouvant atteindre 3 à 4 millimètres de haut; elles présentent des contours nets et s'étendent beaucoup à la surface de la gélatine.

La culture en piqûre est beaucoup moins caractéristique et ne diffère guère de celle des levures précédentes.

Dans le lait, la Levure  $\gamma$  se comporte de la même façon que l'espèce décrite ci-dessus. Son activité, comme ferment alcoolique, est toutefois encore plus grande que chez cette dernière.

Ces deux levures font fermenter les mêmes sucres.

#### *Oospora lactis* Sacc.

Je ne rappellerai pas ici les caractères morphologiques de ce microbe, que les études de Hansen, Duclaux, Brefeld, et plus récemment de de Freudenreich et Lang (1), ont fait connaître d'une façon suffisamment précise.

(1) DE FREUDENREICH et LANG, *Sur l'Oidium lactis*. Annales de Micrographie, t. VI, n° 2, février 1894.

Ses propriétés physiologiques ont été mises en relief par les mêmes auteurs.

Voici d'ailleurs le résultat de l'analyse d'un lait soumis pendant six jours, à 33°, à l'action de l'*Oospora lactis* :

ÉLÉMENTS	Lait primitif.	Lait fermenté.
Eau . . . . .	87,44	91,48
Matière sèche . . . . .	12,56	8,52
Sucre . . . . .	5,08	2,36
Matière grasse . . . . .	3,40	3,38
Caséine totale . . . . .	3,38	2,08
Caséine insoluble . . . . .	3,35	0,43
Caséine soluble . . . . .	0,03	1,65
Cendres totales . . . . .	0,69	0,70
Ammoniaque . . . . .	"	0,086
Alcool . . . . .	"	0,8 % en volume
Acide butyrique . . . . .	"	0,057
Réaction . . . . .	"	Légèrement acide

On voit que sous l'influence de l'*Oospora lactis* :

1° Le sucre de lait est partiellement transformé en alcool;

2° La caséine totale a diminué ; la caséine insoluble a été énergiquement peptonisée sous l'influence de la caséase sécrétée par le microbe.

Des quantités notables de caséone, de sels ammoniacaux et d'acides gras volatils, ont pris naissance aux dépens de la matière azotée.

L'*Oospora lactis* agit donc à la fois comme ferment alcoolique du sucre et comme ferment peptonisant de la caséine.

*Fermentation alcoolique de la lactose due à l'Oospora lactis.*

Les résultats obtenus par différents auteurs sur l'activité de l'*Oospora lactis*, comme ferment alcoolique, sont assez contradictoires.

- Cela provient, à n'en pas douter, de ce qu'il existe de véritables races physiologiques de ce microbe, plus ou moins bien adaptées à la fermentation des sucres.

Les résultats consignés dans le tableau suivant le prouvent à l'évidence.

Quatre variétés d'*Oospora*, très voisines au point de vue morphologique, et ayant les provenances suivantes :

1. Fromage de Herve;
2. Crème aigrie;
3. Fromage dit « Casette »;
4. Lait acidifié,

ont été ensemencées dans du sérum neutralisé. Après quinze jours de séjour à l'étuve, à 35°, les chiffres suivants étaient notés :

VARIÉTÉ	Sucre disparu par litre en poids.	Alcool formé p. 100 en volume.	Acidité (1).
1	25,2 gr.	1,3	2,7
2	41,3 —	2,0	1,6
3	17,0 —	0,7	2,4
4	28,3 —	1,3	3,0

Comme on le voit, la variété n° 2 provenant d'une crème fermentée, constitue un ferment alcoolique beaucoup plus puissant que toutes les autres et, notamment, que la variété 3 qui, en revanche, acidifie davantage le milieu.

L'*Oospora lactis* agit, non seulement sur le sucre de lait, mais encore sur la saccharose qu'il intervertit, la dextrose et la maltose. Il ne saccharifie pas sensiblement

(1) Exprimée en grammes d'acide lactique par litre.

l'amidon et est inactif vis-à-vis de la dextrine, de l'inuline, des gommés, etc.

*Fermentation de la caséine due à l'Oospora lactis.*

L'*Oospora lactis* constitue un ferment énergique de la caséine et doit être rangé parmi les agents actifs de la maturation des fromages.

Pour ce qui concerne plus spécialement le fromage de Herve, il prend une large part dans le processus de l'affinage.

Bien que localisé presque exclusivement dans la couche superficielle du fromage, ses zymases diffusent de proche en proche jusque dans les parties les plus profondes.

Comme je le montrerai plus loin, le même microbe intervient, d'une façon prépondérante, dans la maturation d'un fromage spécial, la « Cassette ».

**Action combinée de ces microbes dans la maturation du fromage.**

Maintenant que nous connaissons les propriétés physiologiques des quatre organismes dont les activités se superposent dans la maturation du fromage de Herve, nous pouvons nous rendre compte de la marche de cette dernière.

Lorsque le caillé égoutté, mis en moule et pressé, est porté au séchoir, il conserve encore une certaine quantité de petit-lait. Le sucre que renferme ce dernier devient rapidement le siège d'une active fermentation lactique, sous l'influence du Bacille  $\beta$  ou du ferment lactique ordinaire.

Lorsque la pression a été insuffisante ou lorsque la coagulation et l'égouttage ont été défectueux, il peut se

faire qu'il reste dans le fromage une quantité de sérum telle, que la dose d'acide lactique produit est incompatible avec l'évolution des ferments peptonisants incapables de se développer dans un milieu très acide.

Le fromage reste alors blanc « mort », et ne fermente pas.

Mais, dans les conditions ordinaires de fabrication, la fermentation lactique est peu intense et le processus de maturation s'établit rapidement.

*L'Oospora lactis* joue un rôle important, dans les débuts de la maturation.

Il remplit de ses filaments dissociés la couche la plus externe de la masse caséuse, en modifie la réaction en brûlant l'acide lactique et surtout en produisant des composés ammoniacaux aux dépens des matières albuminoïdes.

A la faveur de la réaction alcaline ainsi engendrée les bactéries peptonisantes dont les germes préexistaient dans le lait, étaient présentes dans le fromage frais mais n'avaient pu évoluer jusqu'ici, se multiplient abondamment d'abord dans la couche externe puis progressivement vers le centre; la maturation se poursuit ainsi centripète.

Quant à la levure, son rôle est effacé et tout à fait secondaire et l'on peut dire que trois organismes coordonnent leur activité pour assurer la maturation du fromage de Herve; deux bactéries, dont un ferment lactique et un ferment peptonisant, et une moisissure superficielle, *L'Oospora lactis*. Ce dernier joue ici un rôle analogue à celui que remplit le *Penicillium glaucum* dans l'affinage des fromages moisissés, le Brie et le Camembert.

**La méthode synthétique appliquée à l'étude de la maturation  
des fromages.**

Après avoir étudié par voie analytique la nature des organismes qui interviennent dans la maturation du fromage de Herve, j'ai tenté de confirmer les résultats obtenus par une méthode que j'appellerai synthétique et qui consiste à reproduire, à l'aide de microbes purs, agissant sur de la caséine stérilisée, les différentes phases de l'affinage.

Toutefois cette façon de procéder est hérissée de difficultés et ne fournit, comme nous allons le voir, que des résultats peu précis.

Pour être inattaquable, l'expérience doit être faite dans les conditions suivantes : ensemercer du lait, pur de germes, avec le ou les ferments maturatifs, et en tirer un fromage, en évitant toute intrusion d'organismes étrangers.

Mais ce programme est extrêmement difficile à remplir.

Pour obtenir du lait stérile, il faut, ou bien le recueillir dans des conditions strictement aseptiques, par le procédé très délicat indiqué par Duclaux (1), ou bien le stériliser par la méthode des chauffages répétés à 55-60°, en évitant d'atteindre une température telle que le lait perde la propriété de se coaguler par la présure.

Supposons le lait dûment stérilisé et ensemercé à l'aide des ferments dont on veut étudier le rôle dans la maturation.

Pour la coagulation, on aura soin d'employer une présure filtrée à travers un filtre Chamberland.

(1) DUCLAUX, *Le Lait*, p. 6.

Dans la suite des opérations, égouttage, mise en moule, pression du caillé, il est très difficile, malgré la plus grande dextérité et les précautions les plus minutieuses, d'éviter la contamination.

Enfin pour être conduite aseptiquement la maturation doit être effectuée sous une cloche stérilisée.

En procédant de la sorte j'ai pu obtenir deux fromages fermentés, l'un par le Bacille  $\alpha$  et l'autre par l'*Oospora lactis*; mais dans les deux la maturation fut exagérée, le goût et l'odeur très prononcés et désagréables.

Cette maturation anormale est due à plusieurs causes inhérentes au procédé :

1° A un ensemencement trop copieux ;

2° Aux modifications que subissent les éléments du lait chauffé à 55-60° ; à la nature défectueuse du caillé qui en provient ;

3° A la maturation opérée sous cloche dans des conditions anormales.

Cette méthode ne permet de se rendre compte que d'une façon grossière du rôle des microbes étudiés dans la maturation ; elle est impuissante à résoudre les délicates questions de goût et d'arôme développés.

Pour simplifier le procédé, on peut se borner aussi à ensemercer copieusement le lait recueilli, le plus proprement possible, des ferments à étudier de manière à leur assurer la prédominance sur les autres espèces.

On conduit ensuite l'opération à la façon ordinaire.

Ce mode opératoire quoique moins rigoureux donne cependant de meilleurs résultats, quant à la valeur des produits ; toutefois ici encore on observe le plus souvent une maturation exagérée, due à l'ensemencement, forcément trop copieux.

La méthode synthétique n'est donc pas d'un grand secours dans les recherches sur la maturation des fromages.

Il résulte aussi de ces considérations que l'on réalisera très difficilement cette idée, parfois caressée dans ces derniers temps, d'opérer des fermentations pures de fromage, de la même façon que l'on pratique aujourd'hui l'acidification de la crème à l'aide de ferments purs.

Ce dernier phénomène est relativement simple, et résulte de l'activité d'un seul organisme; la maturation des fromages, au contraire, est un processus complexe exigeant, pour s'accomplir, le concours de plusieurs microbes donc l'action n'est pas généralement simultanée, mais bien successive.

Les germes de ces espèces existent d'ailleurs abondamment dans l'atmosphère des étables, des fromageries, sur les ustensiles de fabrication, d'où ils passent dans le lait. Il est donc superflu de les y ajouter artificiellement.

#### Analyses de fromages de Herve.

Rien n'est plus propre que l'analyse du fromage à mettre en relief l'activité des microbes de la maturation.

Pour les analyses dont les résultats suivent, j'ai adopté l'excellente méthode de Duclaux.

#### ANALYSE D'UN FROMAGE MAIGRE ET PEU FERMENTÉ.

Eau . . . . .	50,07 p. 100
Matière sèche . . . . .	49,72 —
Matière grasse . . . . .	7,53 —



Caséine totale . . . . .	38,50	p. 100
— insoluble . . . . .	33,80	—
— filtrable (caséone) . . . . .	4,70	—
Cendres totales . . . . .	4,69	—
Cendres du lait . . . . .	1,29	—
Sel marin . . . . .	2,4	—

Ammoniaque . . . . . 1,7 gr. par kilog.

Acide butyrique . . . . . 2,3 —

Rapport de maturation (1) 0,12 —

On voit que, dans cet échantillon, le processus de maturation n'a pas été fort loin : le rapport de maturation est peu élevé et les quantités d'ammoniaque et d'acide butyrique faibles. Les acides volatils, évalués globalement en acide butyrique, comprennent les acides valérianique, butyrique et un peu d'acide acétique.

#### ANALYSE D'UN FROMAGE DEMI-GRAS ET MÛR

Eau . . . . .	45,1	p. 100
Matière sèche . . . . .	44,9	—
Matière grasse . . . . .	16,8	—
Caséine totale . . . . .	15,80	—
— insoluble . . . . .	15,74	—
— filtrable . . . . .	7,06	—
Cendres totales . . . . .	4,50	—
— du lait . . . . .	1,02	—
Sel marin . . . . .	2,28	—

(1) Par rapport de maturation, Duclaux désigne le rapport  $\frac{\text{caséine filtrable}}{\text{caséine totale}}$  ; plus il est élevé, plus la maturation est avancée.

Ammoniaque . . .	2,7	gr. par kilog.
Acide butyrique . . .	5,3	—
Rapport de maturation .	0,33	—

### Fromage dit « Cassette ».

Ce fromage, dont la préparation varie beaucoup suivant les régions, est généralement obtenu à l'aide de caillé provenant de lait maigre.

Après avoir été parfois chauffé, toujours égoutté et pressé fortement, il est émiété, additionné de sel et souvent aussi de poivre, puis amassé mollement dans une caisse de bois que l'on place dans un endroit chaud (20-25°) ; on a soin de le retourner fréquemment.

Après quelques jours, il est devenu gras au toucher et les particules caséuses s'agglomèrent avec la plus grande facilité.

On en forme alors une boule plus ou moins volumineuse que l'on abandonne à un affinage d'une semaine ou deux.

Pendant ce temps, la croûte du fromage se couvre d'une végétation de mucédinées variées dont il sera parlé plus loin.

*Flore microbienne.* — L'étude de la floré microbienne de ce fromage m'a amené à cette conclusion que l'*Oospora lactis* constitue l'agent presque exclusif de sa maturation. Les conditions ne sont d'ailleurs pas favorables au développement des bactéries. La forte salaison, l'addition fréquente de poivre, l'état de siccité du caillé granuleux, sont autant de causes qui entravent la pullulation des bactéries et assurent la prédominance à l'*Oospora*, beaucoup moins sensible à ces conditions défectueuses.

Comme je le disais plus haut, la surface des boules affiniées se recouvre d'une végétation variée de moisissures.

Parmi ces dernières, deux mucédinées prédominent :

1° *L'Oospora crustacea*, croissant en ilots denses d'un beau rouge brique ;

2° Une autre espèce du même genre, d'une coloration brun-chocolat, et qui jusqu'ici, à ma connaissance du moins, n'a pas encore été décrite.

Elle se présente sous l'aspect de gazonnements très denses, feutrés, en dernier lieu, formant croûte. On y distingue des filaments rampants, irrégulièrement ramifiés et très enchevêtrés, d'abord continus, ensuite abondamment cloisonnés. Sur ce mycélium, s'élèvent des rameaux fasciculés courts, plus ou moins flexueux, portant à leur extrémité les chapelets de spores. Celles-ci sont ovoïdes, légèrement tronquées aux deux bouts et un peu rétrécies à la partie inférieure, mesurant 7 — 10 = 6-7, 5  $\mu$  (fig. 4 de la planche). D'abord hyalines, elles brunissent rapidement et se détachent bientôt.

Ce champignon se cultive aisément sur les milieux ordinaires, gélatine, agar, etc. ; comme il n'intervient pas dans la maturation, de même que *L'Oospora crustacea* (1), je n'en ai pas étudié les propriétés physiologiques.

(1) Voici la diagnose de cette espèce nouvelle, pour laquelle je propose le nom d'*Oospora castanea* :

« *Caespitulis amoene castaneis* (Saccardo, *Chromotaxia*, n° 10), *effusis, indeterminatis, pulverulento-velutinis, confluentibus, in senectute subcrustaeformibus ; hyphis repentibus, vage ramosis, densissimis, intricatis septatis, 5-12  $\mu$  crassis, sporophora adscendentia, recta vel subflexuosa, teretiuscula, rarius subnodulosa, continua, 20 — 38 = 3 — 4  $\mu$ , aggregata, gerentibus ; conidiis catenulatis, ovoideo-globosis utrinque truncatis, levibus, 7 — 9 = 6 — 7,5  $\mu$ , junioribus subhyalinis, aetate brunneis, facillime secedentibus.* » — In superficie casei vetusti.

Species *Oosp. pulvinatae* Sacc. et Vogl. colore plus minus affinis ; sed sporophoris non uniseptatis et conidiis minoribus, non appendiculatis, differt.

**Analyse du fromage dit « Casette ».****ANALYSE DU CAILLÉ MIS EN BOULE ET NON AFFINÉ**

Eau . . . . .	56,50	p. 100
Matière sèche . . . . .	45,50	—
Matière grasse . . . . .	2,10	—
Caséine totale . . . . .	55,70	—
— insoluble . . . . .	27,60	—
— filtrable . . . . .	8,10	—
Cendres totales . . . . .	5,70	—
Sels du lait . . . . .	2,02	—
Sel marin . . . . .	5,68	—
Ammoniaque . . . . .	0,6 gr.	par kilgr.
Acide butyrique. . . . .	non déterminé	
Rapport de maturation	0,22	

**ANALYSE DU MÊME, APRÈS 8 JOURS D'AFFINAGE**

Eau . . . . .	52,7	p. 100
Matière sèche . . . . .	47,3	—
Matière grasse . . . . .	2,30	—
Caséine totale . . . . .	38,9	—
— insoluble . . . . .	28,8	—
— filtrable . . . . .	10,1	—
Cendres totales . . . . .	6,1	—
Sels du lait . . . . .	2,38	—
Sel marin . . . . .	5,72	—
Ammoniaque . . . . .	1,02 gr.	par kilgr.
Acide butyrique . . . . .	non déterminé	
Rapport de maturation.	0,26	

Grâce au peu de complexité du processus de matura-

tion et à l'unité du microbe qui en est l'agent, grâce aussi à la simplicité de la fabrication, j'ai pu appliquer dans ce cas, avec plus de succès, la méthode synthétique et obtenir, à l'aide d'*Oospora lactis* pur et de caséine bouillie, un produit répondant beaucoup au fromage de « Casette ».

L'*Oospora lactis* joue, comme on le voit, un rôle essentiel dans la maturation de ce fromage ainsi que dans celle du fromage de Herve.

Il doit contribuer, pour une large part, à donner à ce dernier produit son goût et son odeur caractéristiques. Aussi, le fabricant en favorise-t-il le développement en maintenant sans cesse humide, par des lavages, la croûte superficielle du fromage.

Mais, si ce microbe joue une rôle éminemment utile dans nos fromageries de Herve, il constitue un véritable agent de maladie pour les fromages moisis (Brie et Camembert) dont il recouvre la surface de plaques gluantes qui entravent le développement de la moisissure désirée, le *Penicillium glaucum*. Aussi la pullulation de l'*Oospora lactis* a-t-elle été souvent un obstacle très sérieux à la fabrication, dans nos laiteries (1), de ces fromages de luxe dont la production serait cependant, pour notre industrie laitière nationale, un élément nouveau de prospérité.

Décembre 1894.

Laboratoire de biologie de l'Institut agricole de Gembloux.

(1) J'ai indiqué ailleurs (*Bulletin de l'Agriculture*, 1894) les moyens de remédier à cette situation.

## EXPLICATION DE LA PLANCHE

---

FIG. 1. Levure  $\alpha$  du fromage de Herve  $\left(\frac{1000}{1}\right)$ .

FIG. 2. Levure  $\beta$  du fromage gonflé  $\left(\frac{1000}{1}\right)$ .

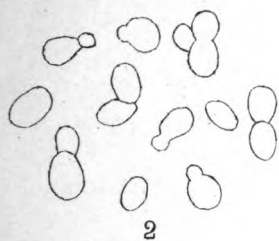
FIG. 3a. Levure  $\gamma$ , cellules courtes  $\left(\frac{1000}{1}\right)$ .

FIG. 2b. — éléments dissociés d'une colonie  $\left(\frac{1000}{1}\right)$ .

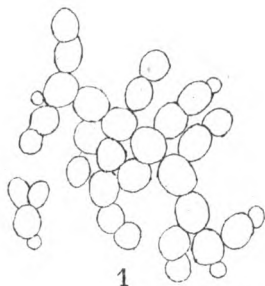
FIG. 3c. — une colonie mycéliiforme  $\left(\frac{400}{1}\right)$ .

FIG. 4. *Oospora castanea*, filaments fructifères  $\left(\frac{600}{1}\right)$ .

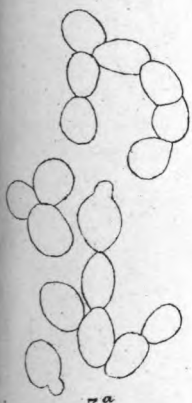
---



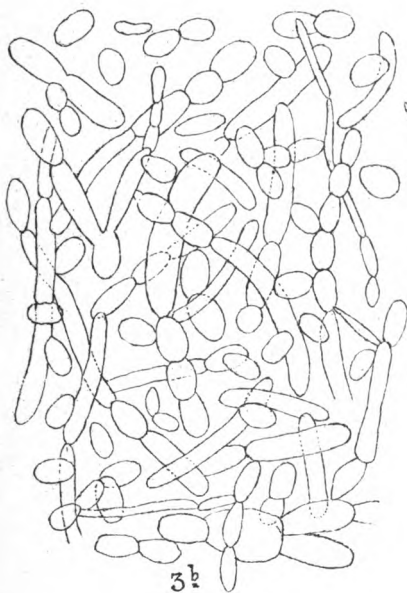
2



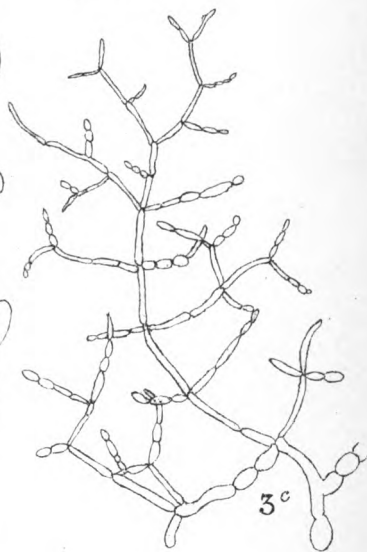
1



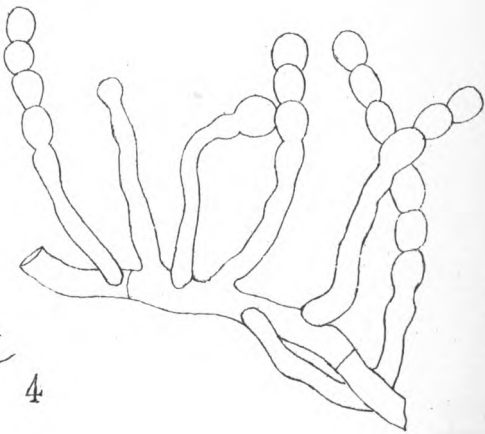
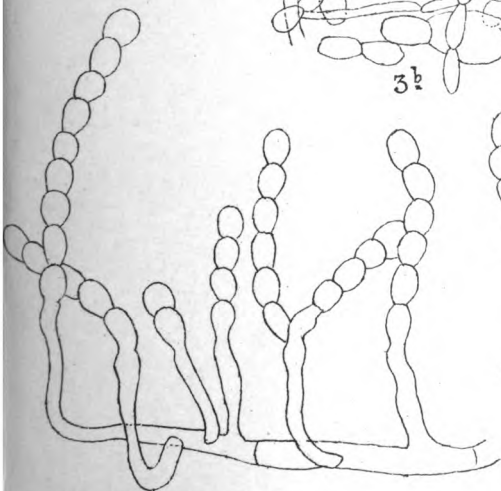
3<sup>a</sup>



3<sup>b</sup>



3<sup>c</sup>



4

*Em. Marchal. ad. nat. del.*