

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم البيولوجيا
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

BELOUTI Fatima Zahra

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER

En sécurité alimentaire et assurance qualité

Thème

**Essai de production de spores de *Penicillium roqueforti*
pour la fabrication d'un fromage type bleu**

Soutenu le 18/09/2022, devant le jury composé de :

Président	TEFFIANI Chokri	MCA	U. Tlemcen
Encadrant	MOUSSA BOUDJEMAA Boumedine	Professeur	U. Tlemcen
Examineur	BENDIMERAD Nahida	MCB	U. Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Dédicace

Je dédie Ce mémoire à :

- ✓ *Mes défunts grands-parents maternels. Puisse Dieu les accueillir en son vaste paradis.*
- ✓ *Ma très chère grande mère paternelle. Puisse Dieu lui accorder la santé.*
- ✓ *Mes parents qui m'ont donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Maman, Papa, tout ce que je peux vous offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je vous porte.*
- ✓ *Mon cher frère Hichem, une dédicace spéciale pour l'amour, l'affection, le réconfort et l'abnégation qu'il a montré à mon égard afin de faire de moi ce que je suis aujourd'hui.*

Remerciements :

Avant tout, Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

La première personne que je tiens à remercier est mon encadrant Pr. Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Je remercie en particulier MR. DERRAZ Mohammed, le directeur technique de la laiterie Halib En-Nadjah pour sa disponibilité, son écoute et sa bienveillance.

Je n'oublierai pas les personnes du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce travail, en particulier Mme DIB Lila

Je remercie Dr TEFFIANI Chokri pour avoir accepté de donner de son temps et de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie particulièrement Dr Bendimerad Nahida pour son aide précieuse durant la période d'expérimentation et pour avoir bien voulu participer au jury de ce mémoire.

Je remercie aussi tous les enseignants de ISTA et du département de Biologie, pour leurs enseignements de qualité et leurs conseils qui m'ont permis de poursuivre mon itinéraire académique jusqu'à présent ;

Merci à toutes et à tous.

لتصنيع الجبن الأزرق *Penicillium roqueforti* محاولة إنتاج أبواغ

تُصنع الأجبان ذات العروق الزرقاء من حليب البقر أو الأغنام أو الماعز. تدين بمظهرها الرخامي إلى تطوير

Penicillium roqueforti أو *P. glaucum*. أثناء عملية التخثر (في بعض الأحيان قبل أو في بعض الأحيان في وقت التشكيل) ، يتم تلقيحها بجراثيم *Penicillium roqueforti* أو *P. glaucum* قوالب مزرقّة يمكن رؤيتها على الجبن وتعطيها مظهر رخامي. أثناء عملية النضج ، يحتاجون إلى الأكسجين ليكتسبوا لونهم المزرق. في هذه المرحلة، تم اعتماد الخياطة الفنية ، حصريًا لهذا النوع من الجبن. يخلق الالتقاط ثقبًا ، مما يسمح للأكسجين باختراق الجبن وتكوين العفن. بناءً على هذه المؤشرات ، تم تقسيم هذا العمل إلى مرحلتين: الأولى ، والتي من خلالها قمنا بإنتاج أبواغ *Penicillium roqueforti* بالطريقة التقليدية باستخدام خبز الشعير المطبوخ جيدًا كركيزة. كانت المرحلة الثانية محاولة لإنتاج جبن أزرق باستخدام أبواغ *Penicillium roqueforti* المنتجة مسبقًا.

الكلمات المفتاحية: *Penicillium roqueforti* – جبن الأزرق – الرقفور – عفن – أبواغ- حليب

Essai de production de spores de *Penicillium roqueforti* pour la fabrication d'un fromage type bleu

Les fromages à pâte persillée (communément appelés bleus) sont fabriqués à partir de lait de vache, de brebis ou de chèvre. Ils doivent cet aspect persillé au développement du *Penicillium roqueforti* ou *P. glaucum*. Concernant leur fabrication, au cours de la coagulation (parfois avant ou parfois au moment du moulage), ils sontensemencés avec des spores de *Penicillium roqueforti* ou *P. glaucum* : moisissures bleuâtres que l'on peut voir sur le fromage, et qui donnent cet aspect persillé. Lors de l'affinage, ils ont besoin d'oxygène pour acquérir leur couleur bleuâtre. C'est à ce moment-là qu'est adoptée la technique du piquage, exclusivement réservée pour ce genre de fromage. Le piquage crée des trous, permettant à l'oxygène de pénétrer dans le fromage et à la moisissure de se développer. Sur la base de ces indications, ce travail a été divisé en deux phases : la première, à travers laquelle nous avons produit des spores de *Penicillium roqueforti* de manière traditionnelle en utilisant comme substrat du pain d'orge bien cuit. La seconde phase, a été une tentative de fabrication d'un fromage bleu en utilisant les spores de *Penicillium roqueforti* précédemment produites.

Mots clés : fromage bleu - *Penicillium roqueforti* - roquefort – moisissures – spores- lait

Trial for the production of *Penicillium roqueforti* spores for the manufacture of a blue cheese

Blue-veined cheeses are made from cow's, sheep's or goat's milk. They owe their marbled appearance to the development of *Penicillium roqueforti* or *P. glaucum*. During the coagulation process (sometimes before or sometimes at the time of moulding), they are inoculated with spores of *Penicillium roqueforti* or *P. glaucum*: bluish moulds that can be seen on the cheese and which give it its marbled appearance. During the ripening process, they need oxygen to acquire their bluish colour. It is at this point that the piquage technique is adopted, exclusively for this type of cheese. The pricking creates holes, allowing oxygen to penetrate the cheese and mould to develop. Based on these indications, this work was divided into two phases: the first, through which we produced *Penicillium roqueforti* spores in the traditional way using well-cooked barley bread as substrate. The second phase was an attempt to produce a blue cheese using the previously produced *Penicillium roqueforti* spores.

Key words: blue cheese - *penicillium roqueforti* - roquefort – mold – milk

Tables des matières :

Dédicace.....	1
Remerciements :.....	2
LISTE DES TABLEAUX :	6
LISTE DES FIGURES :	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS :.....	8
Introduction :.....	2
I. Penicillium roqueforti.....	3
I.1 Position taxonomique :	3
I.2 Caractères phénotypiques et physiologiques :	4
I.2.1 Morphologie macroscopique des colonies :	4
I.2.2 Morphologie microscopique :.....	5
I.3 Conditions de développent :.....	7
I.4 Ecologie :	10
II. Propriétés fonctionnelles du Penicillium roqueforti en fromagerie :	12
II.1 Lipolyse :	12
II.2 Protéolyse et dégradation des acides aminés :	14
II.3 Production d'arômes :.....	17
II.4 Pigments	20
III. Les fromages à pâte persillée :	21
III.1 Historique :.....	21
III.2 Définition normative des fromages à pâte persillée :.....	21
III.3 Classification des fromages à pâte persillée :	22
III.4 Composition et valeur nutritionnelle des fromages à pâte persillée :.....	24
III.5 Les étapes de fabrication des fromages à pâte persillée	29
III.5.1 Le roquefort :	30
III.5.1.1 Présentation du fromage :.....	30
III.5.1.2 Les étapes de fabrication du Roquefort	31
III.5.1.2.1 Homogénéisation du lait :.....	31
III.5.1.2.2 Caillage et brassage :	31
III.5.1.2.3 Egouttage :	32
III.5.1.2.4 Salage :.....	32
III.5.1.2.5 Piquage :	33

III.5.1.2.6 Affinage :	33
III.5.1.2.7 Emballage et la maturation :	33
IV. Matériels et méthodes :	36
IV.1 Méthodes :	36
IV.1.1 Production de spores de <i>P. roqueforti</i> :	36
IV.1.2 Analyse physico-chimique du lait matière première :	37
IV.1.2.1 Mesure du pH :	37
IV.1.2.2 Détermination de l'acidité titrable :	37
IV.1.2.3 Méthode volumétrique (titrage avec NaOH 0,111 N ou N/9).	37
IV.1.2.4 Test d'antibiotique :	39
IV.1.3 Coagulation et obtention du caillé :	40
IV.1.4 Analyses sensorielles :	40
IV.1.4.1 Test hédonique :	41
IV.1.4.2 Profil sensoriel :	41
V. Résultats et discussion :	42
V.1 Résultats des analyses physico-chimiques du lait	42
V.2 Obtention des spores de <i>P. roqueforti</i>	42
V.3 Obtention du fromage.....	43
Résultat du test sensoriel.....	46
Conclusion générale	47
Références bibliographiques :	48
Annexes :	59

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Concentrations en acides gras libres (AGL) retrouvées au niveau de certains fromages	13
Tableau 2 : Principales enzymes produites par <i>P. roqueforti</i> impliquées dans la protéolyse et le catabolisme des acides aminés durant l'affinage	17
Tableau 3 : Structure de quelques méthyl-cétones et leurs niveaux de présence dans différents fromages à pâte persillée	18
Tableau 4 : Concentration totale ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de fromage) des principaux groupes de composés aromatiques retrouvés au sein de différents fromages à pâte persillée	19
Tableau 5 : Sous-famille des fromages bleus et / ou des pâtes persillées	22
Tableau 6 : Composition nutritionnelle détaillée du roquefort (d'après l'ANSES).....	25
Tableau 7 : la teneur des additifs alimentaires pour 100 g du roquefort / fromage à pâte persillée (d'après l'ANSES)	28
Tableau 9 : Résultats des tests physico-chimiques du lait de vache cru utilisé pour la fabrication du fromage bleu	42

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 Morphologies de deux isolats de <i>Penicillium roqueforti</i> , KE28G (haut) et LS04A (bas), cultivées sur CYA (A), YES (B) et MEA (C) pendant 7 jours à 25°C (O'Brien et al., 2008).....	5
Figure 2 : Présentation des différents éléments constituant un pinceau de <i>Penicillium roqueforti</i> http://biologie.ens-lyon.fr	7
Figure 3 : Voies de dégradation possibles des acides gras (d'après Collins et al., 2004).	12
Figure 4 : Voies de dégradation au cours de la protéolyse et du catabolisme des acides aminés durant l'affinage des fromages (d'après McSweeney, 2004).	15
Figure 5: teneur en protéines, glucides et lipides pour 100 g du fromage à pâte persillée (d'après CIQUAL-Anses, 2014)	25
Figure 6 : schéma de fabrication du fromage à pâte persillée (Source : ACTALIA).....	29
Figure 7 : Aspect interne du fromage Roquefort	30
Figure 8 : Les étapes de fabrication du roquefort AOP telles qu'elles se déroulent à la Société Fromagère de Saint-Affrique (Anonyme, 2015)	34
Figure 10 : Aspect du pain d'orge en miettes avant et après sporulation de <i>P. roqueforti</i>	42
Figure 11 : Observation macroscopique et microscopique de <i>Penicillium roqueforti</i>	43
Figure 12 : les étapes de fabrication du fromage bleu	43
Figure 13: Aspect du fromage et développement du <i>P.roqueforti</i> pendant 21 jours	45
Figure 14 : profil sensoriel du fromage	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

AOP : Appellation d'origine protégée

cmdA : calmodulin

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

G25N : Glycerol Nitrate Agar à 25%

IMCU : International Milk Clothing Unit

ITS : Internal Transcribed Spacer

MEA : Malt extract Agar (Gélose à l'extrait de malt)

P. : Penicillium

rpb2 :RNA polymerase II second largest subunit in the Basidiomycota

tub2 : β -tubulin

YES : Yeast Extract Sucrose

Introduction générale :

Le fromage a toujours été une valeur sûre de l'alimentation humaine. Il est le résultat d'une pratique très ancienne de transformation du lait. En effet, des écrits témoignent de sa fabrication quelque trois mille ans avant notre ère en basse Mésopotamie.

. Parmi les fromages français les plus célèbres les fromages bleus dont le Roquefort.

En Algérie, la production locale est essentiellement spécialisée en fromage fondu, en fromage à pâte molle de type camembert-brie et en fromages de type petits suisses naturels ou aromatisés. Les fromages bleus ne sont pas encore fabriqués en Algérie

Dans ce contexte, le présent travail est un essai de production des spores de *P.roqueforti* pour la fabrication d'un fromage type bleu .

Le manuscrit s'articule en trois parties. La première consiste en une synthèse bibliographique sur *Penicillium roqueforti* notamment ses propriétés fonctionnelles en fromagerie et les fromages bleus.

La deuxième partie expose le matériel et les méthodes utilisées dans la partie expérimentale. Principalement, la production des spores *Penicillium roqueforti* de manière artisanale et la fabrication d'un fromage type bleu à partir d'un lait de vache et des spores obtenues.

En dernière partie, les résultats obtenus sont présentés et discutés.

Partie Première :
Synthèse bibliographique

Introduction :

Les fromages bleus ou à pâte persillée sont caractérisés par la prolifération de la moisissure *Penicillium roqueforti*, qui leur donne leur aspect et leur saveur typiques. Le fromage bleu est produit dans de nombreux pays du monde entier, qui ont développé leurs propres types de fromages bleus, chacun ayant des caractéristiques différentes et impliquant des méthodes de fabrication différentes (Cantor, 2017) . L'aspect typique des différentes variétés dépend du développement du *Penicillium roqueforti* pendant la maturation. (Ardö, 2016) .

Le véritable Roquefort est fabriqué à partir de lait de brebis frais non pasteurisé. Le caillé coupé est inoculé de *Penicillium roqueforti*. Une fois pressés dans des moules, les fromages sont amenés à Roquefort de toute la France, où ils sont percés avec des brochettes pour ouvrir des canaux d'air dans lesquels la moisissure peut se développer. Le fromage s'affine exclusivement dans les caves ou grottes naturelles d'une montagne de Roquefort. Le processus de maturation dure 20 jours en conditions aérobies, puis 3 mois en conditions anaérobies, enveloppé dans du papier d'aluminium. Les enzymes protéiques et celles qui éliminent les graisses restent actives. (Renneberg *et al* ; 2017)

Dans ce type de fromage, *Penicillium roqueforti* joue évidemment, au cours de l'affinage; un rôle essentiel dans le développement de l'arôme caractéristique du fromage. Les conditions de son développement et son activité enzymatique ont déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Cependant, le fromage de Roquefort contient, en plus de la moisissure bleue, une flore microbienne très variée dont l'influence sur les qualités organoleptiques du fromage est probablement loin d'être négligeable (Devoyod, 1968)

Penicillium roqueforti est un champignon saprophyte, trouvé dans des environnements naturels (sol forestier et bois), bien que son réservoir naturel reste inconnu. (Gillot *et al.*, 2015) il est aussi un altérateur bien connu de l'alimentation humaine et animale (c'est-à-dire les fromages râpés, le pain de seigle, l'ensilage, etc.) (Samson *et al.*, 2010) mais elle est surtout connue pour son utilisation technologique pour la production et l'affinage des fromages à pâte persillée dans le monde entier. Dans ce contexte, *P. roqueforti* est utilisée comme culture d'appoint pour la production de nombreux fromages (par exemple, le Roquefort, la Fourme d'Ambert et les Bleus en France, le Cabrales et le Valdeón en Espagne, le Danablu au Danemark, le Gorgonzola en Italie, le Stilton et le Dorset Blue au Royaume-Uni, le Niva en République tchèque, le Bleuchâtel en Suisse). (Dumay, 1982).

I. *Penicillium roqueforti*

I.1 Position taxonomique :

Penicillium roqueforti appartient à la section Roquefortorum du genre *Penicillium*, qui comprend également les espèces *P. carneum*, *P. paneum*, *P. psychrosexualis* (Houbraken *et al.*, 2016) et *P. mediterraneum* (Guevara-Suarez *et al.*, 2020). Alors que les trois premières espèces ont été séparées sur la base de productions d'extrolites différentes et de polymorphismes de séquences de b-tubuline (Boysen *et al.*, 1996), (Samson et Frisvad, 2004), *P. psychrosexualis* a été incluse dans cette section sur la base d'un positionnement phylogénétique unique et de sa capacité à former des cleistothèces à basse température (Houbraken *et al.*, 2010). Quant à *P. mediterraneum*, isolé à partir de divers échantillons d'excréments d'herbivores en Espagne, une analyse concaténée, utilisant l'ITS (Internal Transcribed Space), *tub2* (β -tubulin), *cmdA* (calmodulin) et *rpb2* (RNA polymerase II second largest subunit in the Basidiomycota), a conduit à sa description comme une nouvelle espèce en raison de l'absence d'identification de la nouvelle espèce en raison de l'unicité des trois dernières séquences (Guevara). Trois dernières séquences (Guevara-Suarez *et al.*, 2020). Pour *P. roqueforti*, comme indiqué, diverses morphologies mais aussi des niches écologiques ont été signalées et plusieurs noms "technologiques" ont été utilisés dans le passé (par exemple, *P. glaucum*, *P. gorgonzolae*, *P. stilton*, pour n'en citer que quelques-uns) (Gillot *et al.*, 2015).

Pourtant, le critère de reconnaissance des espèces phylogénétiques par concordance généalogique GCPSR (Genealogical concordance phylogenetic species recognition), qui reconnaît l'émergence d'espèces phylogénétiques aux transitions entre la concordance (due à la fixation des loci polymorphes suite à un isolement génétique) et l'incongruence (due à la recombinaison au sein d'une espèce) entre différentes généalogies (Taylor *et al.*, 2000). Gillot *et al.*, (2015) ont indiqué que *P. roqueforti* serait une seule espèce ou comprendrait des espèces cryptiques récemment dérivées d'une espèce ancestrale avec un tri incomplet des polymorphismes génétiques.

Le premier génome séquencé de *P. roqueforti* (souche FM164) a été rendu public en 2013 (accession d'assemblage GenBank : GCA_000513255.1) (Cheeseman *et al.*, 2014). Il a une taille de 28,05 Mb avec un GC% de 48,7 % et 12425 gènes ont été prédits correspondant potentiellement à 12319 protéines, ainsi que 10⁶ pseudogènes.

I.2 Caractères phénotypiques et physiologiques :

I.2.1 Morphologie macroscopique des colonies :

Penicillium roqueforti est un champignon qui se développe rapidement sur les milieux MEA (Malt Extract Agar) et CYA (Czapek Yeast Agar) en atteignant un diamètre généralement compris entre 40 et 70 mm après 7 jours de croissance à 25°C (Pitt et Hocking, 2009). Le champignon est caractérisé par un thalle ras à l'aspect de velours, un mycélium blanc et une production de conidies modérée à intense qui explique en partie la gamme de couleur étendue observée. Les conidies arborent généralement des nuances de couleur bleu-verte et sont occasionnellement accompagnées de gouttelettes d'exsudat à l'aspect hyalin (Samson *et al.*, 2010). Cependant, il est très souvent observé plusieurs nuances de couleurs au sein d'un même thalle. Ainsi, une couleur grisâtre presque blanche avec des reflets turquoise peut être observée à la marge alors que le reste du thalle sera d'un vert qualifié de terne et que le centre de la colonie sera de couleur olive brune. Il en est de même pour le revers, pouvant être très pâle, mais pouvant également aller jusqu'à des nuances plus sombres de vert. La marge de la colonie est généralement de forme arachnoïde (Samson *et al.*, 2010).

Le diamètre des colonies sur le milieu G25N (gélose à 25% de Glycérol Nitrate) est habituellement compris entre 20 et 22 mm après 7 jours d'incubation à 25°C mais la marge est parfois plus étalée et amène le diamètre jusqu'à 28 mm. Les couleurs observées sont généralement similaires à celles observées sur les milieux CYA et MEA. Sur CYA, les colonies mesurent entre 2 et 5 mm de diamètre après 7 jours de croissance à 25°C et le champignon ne se développe pas à 37°C (Pitt and Hocking, 2009). Sur la gélose YES (Yeast Extract Sucrose), le diamètre de croissance est généralement compris entre 38 et 71 mm après 7 jours de croissance à 25°C.

Le degré de sporulation est, lui, très élevé et le revers est d'un vert très foncé. Sur le milieu CREA (gélose à la créatine), une bonne croissance est observée mais pas de production d'acides (Samson *et al.*, 2010). Sur le milieu CSN, les colonies mesurent entre 25 et 40 mm de diamètre après 7 jours de croissance à 25°C, la croissance est importante (même si elle est peu profonde), la réaction au milieu est variable, d'acide (jaune) à alcalin (violet). Le revers est habituellement violet (Pitt and Hocking, 2009). La Figure 1 illustre l'aspect de deux isolats de *Penicillium roqueforti* cultivées sur les différents milieux cités précédemment.

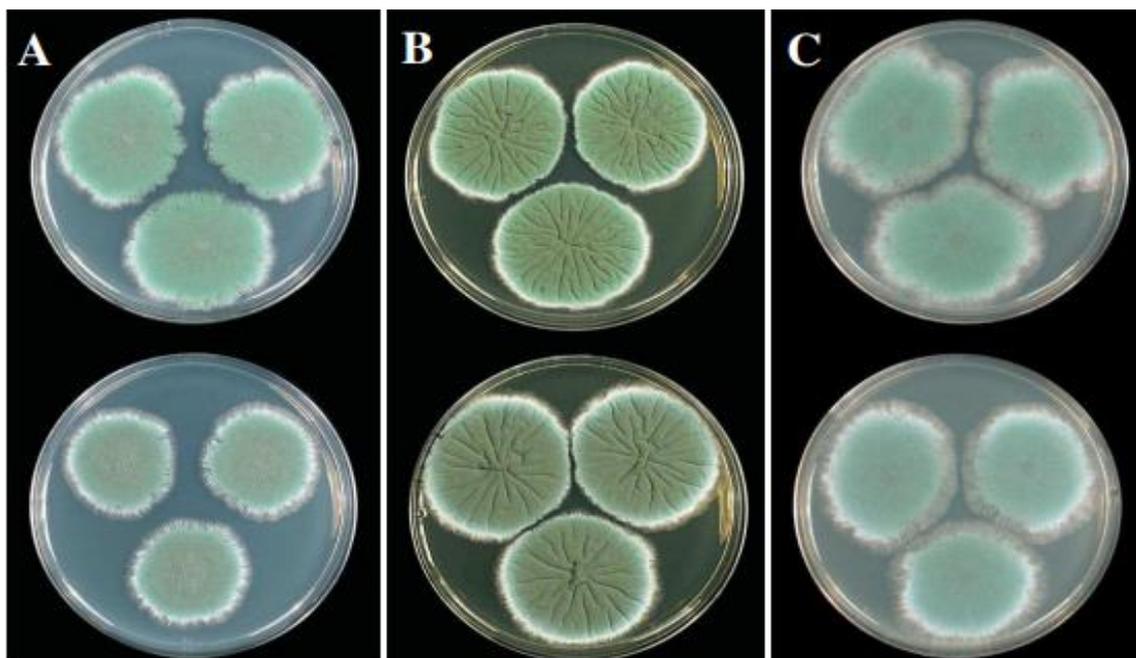


Figure 1 Morphologies de deux isolats de *Penicillium roqueforti*, KE28G (haut) et LS04A (bas), cultivées sur CYA (A), YES (B) et MEA (C) pendant 7 jours à 25°C (O'Brien et al., 2008).

I.2.2 Morphologie microscopique :

Les hyphes hyalins septés (1,5-5 μm de diamètre) portent des conidiophores ramifiés ou non ramifiés. La première cellule du conidiophore est appelée cellule pied; les branches secondaires sont connues sous le nom de métules. Les métules sont plus ou moins cylindriques, à parois lisses, portant de trois à six phialides en forme de bouteille (Patterson, *et al.*, 2009) ; Larone, 1987 ; Hoekstra, *et al.*, 1984). Les phialides produisent de longues chaînes sèches de petites spores rondes à ovales (2,5-5 μm).

Les souches de *P. Roqueforti* peuvent être classées en quatre catégories selon le type de ramification des conidiophores.

La souche est dite monoverticillée quand la cellule pied se termine directement en un conidiophore en forme de pinceau (penicillus) de phialides, c'est-à-dire sans cellules intermédiaires ramifiées. Si le penicillus est embranché, il peut être ramifié à un étage (biverticillé), à deux étages (triverticillé) ou à trois étages (quaterverticillé).. Les conidies sont la plupart du temps presque sphériques ou ellipsoïdes, rarement cylindriques ou fusiformes; les conidies sont petites, de 2,5-4 μm , hyalines ou légèrement verdâtres, à paroi lisse, habituellement produites en chaînes divergentes ou en colonnes lâches (Samson *et al.*, 1984, Gravesen *et al.* 1994 ; Ellis, 2007, Patterson *et al.*, 2009). Les spores solitaires de *Penicillium*

ne peuvent pas être différenciées des spores d'*Aspergillus* ou des autres genres possédant de petites spores rondes et ovales, incolores ou légèrement pigmentées. Les chaînes de conidies unicellulaires (ameroconidies) sont produites en succession basipétale, à partir d'une cellule conidiogène spécialisée appelée phialide. Le terme de conidiogenèse acropète (basocatenate) est souvent employé pour décrire de telles chaînes de conidies, où la plus jeune conidie est à la base de la chaîne, c'est-à-dire qu'elle est la cellule proximale de la chaîne.

Chez les *Penicillium*, les phialides sont produites soit séparément, soit en groupes, soit à partir des métules ramifiées et donnent un ensemble ressemblant à un pinceau, connu sous le nom de penicillus ou pénicille. Le penicillus peut donc contenir des branches et des métules (les branches pénultièmes qui soutiennent une spirale des phialides). Toutes les cellules situées entre les métules et les pieds des conidiophores sont désignées sous le nom de branches. Les conidiophores sont hyalins et peuvent être à paroi lisse ou rugueuse. Les phialides sont souvent en forme de bouteille et se composent soit d'une cellule à base cylindrique avec un cou distinct, soit d'une cellule lancéolée, c'est-à-dire à base étroite effilée se terminant en un apex légèrement pointu. Les conidies sont sphériques, ellipsoïdes, cylindriques ou fusiformes, hyalines ou verdâtres, lisses ou rugueuses. Quelques espèces produisent des sclérotés (Samson., *et al* 2004).

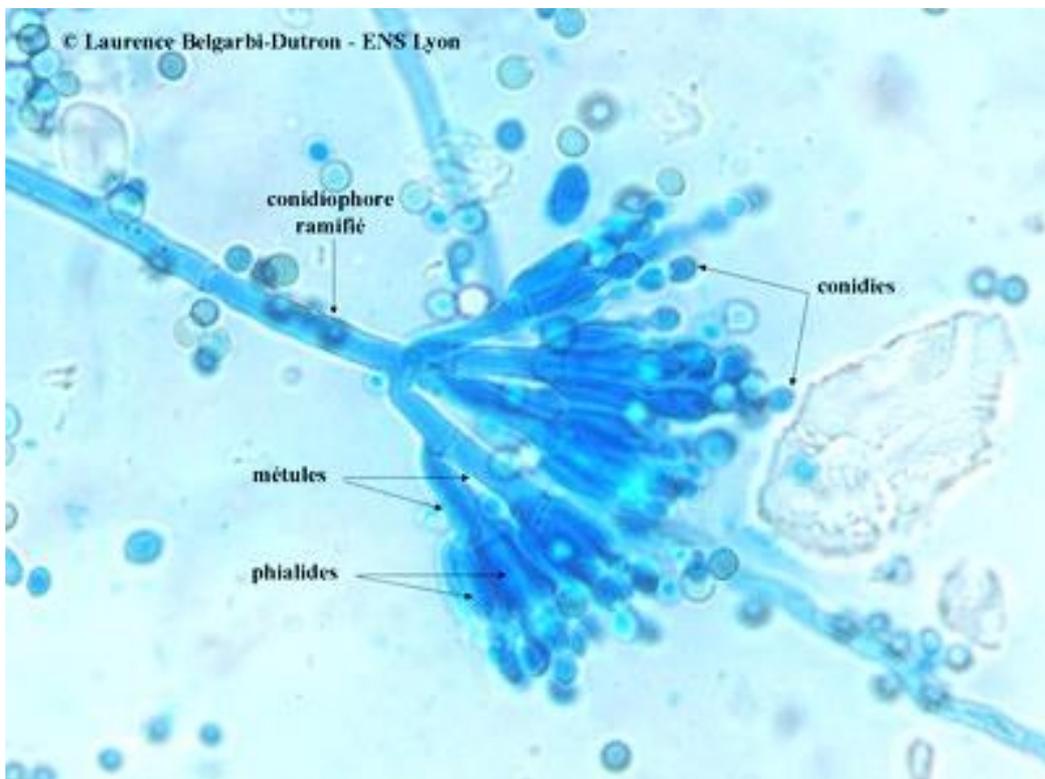
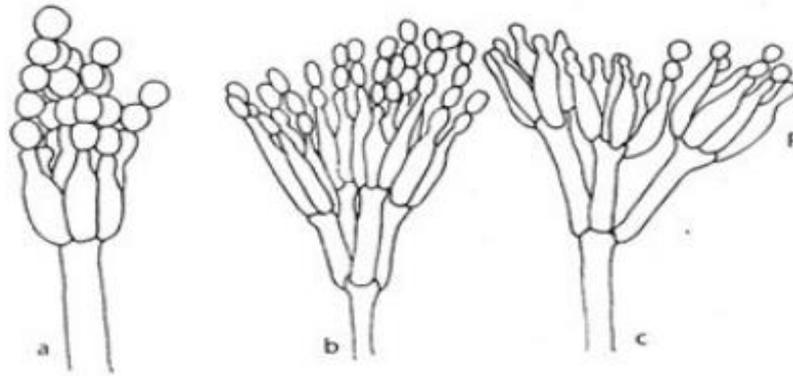


Figure 2 : Présentation des différents éléments constituant un pinceau de *Penicillium roqueforti* <http://biologie.ens-lyon.fr>

I.3 Conditions de développement :

Penicillium roqueforti possède des traits physiologiques très spécifiques qui expliquent son écologie, et notamment sa capacité à coloniser et à se développer dans les fromages à pâte persillée (Chavez *et al.*, 2011). L'impact des facteurs abiotiques est étudié depuis longtemps et aujourd'hui, on utilise des modèles mathématiques pour décrire le comportement de *P. roqueforti* (croissance, germination des conidies et métabolisme) en fonction des variations des facteurs abiotiques (température, pH, activité de l'eau, etc.).

Le faible besoin en O₂ et la capacité à se développer à des concentrations élevées de CO₂ sont parmi les principaux traits physiologiques distinctifs de *P. roqueforti*, ce qui en fait l'une des rares espèces fongiques microaérophiles. Cette espèce tolère une faible teneur en oxygène (5 %) (Fairclough *et al.*, 2011) et une croissance a été signalée à 1 % d'O₂ et 40 % de CO₂ sur du fromage (avec une réduction de 11,5 % du diamètre des colonies par rapport à l'air) (Taniwaki *et al.*, 2001). Des expériences sur des tranches de cheddar ont montré que dans des atmosphères à 20 % de CO₂/5 % d'O₂, 20 % de CO₂/1 % d'O₂, 40 % de CO₂/5 % d'O₂ et 40 % de CO₂/1 % d'O₂, le diamètre des colonies était réduit respectivement de 39, 31, 27 et 11,5 %, par rapport à l'air (Taniwaki *et al.*, 2001). Il a été montré que la croissance est stimulée par un taux de CO₂ allant jusqu'à 15 % dans l'air et peut même se produire à 80 % de CO₂, à condition que le niveau d'O₂ soit au moins équivalent à 4,2 % (Taniwaki *et al.*, 1997).

Ces conditions sont compatibles avec les conditions rencontrées dans les veines de fromage bleu mais aussi dans l'ensilage (c'est-à-dire les "poches" à faible teneur en oxygène dues à un compactage inefficace). Dans une atmosphère contenant 80% de CO₂, 4,2% d'O₂ et 15,8% de N₂, il a été montré que le taux de croissance de *P. roqueforti* était de 30% de celui à l'air, à condition que la température soit supérieure à 20 °C (Golding, 1945).

Dans une atmosphère à 20% O₂/80% CO₂, sur les milieux de Czapek (CYA) et de Potato Dextrose Agar (PDA), la croissance et la sporulation fongiques ont été observées mais le diamètre des colonies et la longueur des hyphes ont été réduits (plus de 80% et 60%, respectivement), par rapport à ceux dans l'air (Taniwaki *et al.*, 2010).

La modélisation des effets de la pression partielle d'O₂ et de CO₂ sur la germination des conidies de *P. roqueforti* (réciproque du temps médian de germination -t₁- et du pourcentage maximal de germination -P_{max}-) a montré que la moitié des conidies étaient encore capables de germer à 0,3 % d'O₂ et à 84,8 % de CO₂, mais que les temps médians de germination étaient prolongés (respectivement 3,5 fois et 1,9 fois par rapport à l'air) (Nguyen The *et al.*, 2017a).

En ce qui concerne l'effet de la température, *P. roqueforti* présente une croissance optimale à 25 °C. Ce champignon ne peut pas se développer au-delà de 35 °C, mais peut encore bien se développer à des températures aussi basses que 5 °C (Leggieri *et al.*, 2017), compatibles avec les différentes étapes de fabrication du fromage à pâte persillée mais provoquant également l'altération des denrées alimentaires réfrigérées. Il en va de même pour les valeurs cardinales de germination des conidies qui ont été estimées à T_{min} < 0 °C, T_{opt} ¼ 26,9 °C et T_{max} ¼ 33,5 +C (Kalai *et al.*, 2017). Il a récemment été établi que les temps de

germination des conidies étaient significativement réduits lorsque des températures plus basses étaient appliquées pendant le stade de sporulation (réduction de 45 h à 5°C par rapport à 20 C) (Nguyen *et al.*, 2017b).

Quant à l'impact de l'*aw*, la croissance a été observée dans une fourchette de 0,87 à 0,99 (croissance optimale à *aw* 0,99) (Leggieri *et al.*, 2017), avec une phase de latence non impactée pour des valeurs d'*aw* > 0,92 (Valik *et al.*, 1999) ; ceci est également compatible avec les valeurs finales d'*aw* des fromages à pâte persillée (0,91- 0,94). Pour la germination des conidies, les valeurs minimales et optimales de l'*aw* correspondaient respectivement à 0,83 et 0,99 (Kalai *et al.*, 2017), et des valeurs d'activité de l'eau plus faibles pendant la conidiation ont réduit le temps de germination des conidies (8 h de moins à l'*aw* 0,90 qu'à 0,98) (Nguyen *et al.*, 2017c). Le NaCl qui est utilisé comme exhausteur de goût et conservateur pendant la fabrication du fromage diminuera l'*aw* du produit final. Après le salage et tout au long de la maturation, un gradient de sel se formera de la surface du fromage vers le cœur et un équilibre sera lentement atteint. La teneur finale en sel du fromage à pâte persillée varie de 1,5 % à environ 4 % du poids total du fromage (Hashem *et al.*, 2014). La croissance de *P. roqueforti* est stimulée à de faibles concentrations de sel, 1 % de NaCl ayant l'effet stimulant le plus élevé (Lopez- Diaz, 1996). Il convient de noter que, par rapport au glycérol (un autre dépresseur d'*aw*), le NaCl a augmenté l'effet fongistatique, et a entraîné un retard de latence et une réduction du taux de croissance radiale sur PDA (Nguyen *et al.*, 2017b).

Quant à l'impact du pH, *P. roqueforti* pousse de pH 3,0 à 10,5 (Moreau., 1980). Le pH optimal est de 6,0 (Fairclough *et al.*, 2011), tandis que pH_{min}, pH_{opt} et pH_{max} pour la germination sont respectivement de 2,9 et 5,6 et 13,8 (Kalai *et al.*, 2017). Il a été démontré que *P. roqueforti* tolère les conservateurs acides faibles. Dans un bouillon mMRS à pH 4,5, l'acide sorbique s'est révélé être l'inhibiteur le plus fort avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,2 mM (Quattrini *et al.*, 2019). Après l'acide sorbique, les valeurs de CMI de croissance obtenues étaient les suivantes, acide propionique (12,0 mM), acide acétique (25,0 mM) et acide 3-phényllactique (50 mM) (Quattrini *et al.*, 2019). Il convient de noter que les combinaisons acides acétique/propionate de calcium et acide sorbique/acide acétique ont présenté des effets additifs avec des valeurs de CMI (3,1/6,2 mM et 0,2/6,2 mM, respectivement) inférieures aux CMI individuelles (Quattrini *et al.*, 2019). Pour l'acide lactique, la CMI de germination n'a pas pu être déterminée car les conidies de *P. roqueforti* ont germé dans des concentrations allant jusqu'à 1 M ; cependant, le temps de germination a

été multiplié par environ 1,5 à 1 M par rapport au milieu sans acide lactique. Pour l'acide propionique, un effet non linéaire a été observé, mais la valeur de la CMI de germination était de 0,796 M sur PDA à pH 5,6 (Kalai, *et al.*, 2017) ;(Leggieri et al , 2017) ont également étudié les effets de la température et de l'*a_w* sur la production de mycotoxines. Les métabolites choisis étaient l'acide mycophénolique (MPA), la roquefortine C (ROQ C) et la PRtoxine mais cette dernière n'a pas été produite dans les conditions testées. Le MPA et la ROQ C ont été produits à des niveaux maximaux à une température de 20 C et à une *a_w* de 0,96. Des différences significatives pour la production de toxines ont également été observées en fonction des conditions environnementales testées.

Par rapport aux conditions de croissance optimales (milieu YES agar, pH 4,5 incubé à 25 C, sous air atmosphérique), une diminution significative de la production de ROQ C (Roquefortine C) et de MPA (MycoPhenolic Acid) a été observée lorsque les paramètres de croissance étaient modifiés individuellement (12 °C ou diminution du rapport C/N par l'ajout de 50 g de concentré protéique de lait L1 ou ajout de 95 % N₂/5 % O₂ ou 8% NaCl). L'augmentation du pH de 4,5 à 6,5 a légèrement réduit la production de MPA mais pas celle de la ROQ C et l'ajout des précurseurs d'extrolites (histidine et tryptophane) n'a eu aucun effet significatif.

Tolérance au sel : En milieu acide, *P. roqueforti* tolère de fortes concentrations en sel (Thom, Currie ,.1913). Sa croissance est meilleure en présence de 5% à 8,5% de sel qu'en l'absence de sel (Forge ,*et al* ,.1977)..

Tolérance à l'alcool : Après 2 mois d'immersion dans du vin, des thalles de *P. roqueforti* n'ont rien perdu de leur vigueur; les spores semblent même stimulées tant au point de vue pourcentage de germination que vitesse de croissance des tubes germinatifs (Moreau ,.1978).

Exigences nutritionnelles : *P. roqueforti* : n'utilise pas la leucine, la cystéine et la méthionine comme source de carbone mais utilise faiblement la lysine et la glycine. *P. roqueforti* est capable d'utiliser le sulfate d'ammonium comme seule source d'azote (Meyers , Knight ,.1961).

I.4 Ecologie :

Si le substrat de prédilection du *P. roqueforti* est le fromage persillé, il est capable d'envahir d'autres types de fromages, causant alors des accidents de fabrication, Ainsi, il est parfois observé à l'intérieur de certains camemberts (Gueguen et *al*, 1978). Dans le cas des

Camemberts et des pavés d'Auge; il se développe surtout dans des fromages préparés « à la louche ». Lorsque l'une des louches ne s'est pas bien ressoudée à la précédente, ou bien dans des « trous de moulage » liés à un mauvais égouttage et une fermentation lactique insuffisante. Il a été également rencontré dans des Emmentals éclatés en raison d'un excès de ferments butyriques. Dans tous les cas, ces contaminations étaient en relation avec une contamination des produits laitiers par des spores de *P. roqueforti* provenant des ensilages consommés par les vaches.

En effet, les ensilages constituent également un excellent substrat pour *P. roqueforti*. Il se localise alors dans des « poches » lorsque le tassement est insuffisant; l'atmosphère appauvrie en oxygène, les fermentations des produits qui l'entourent sont favorables à son développement. Il y est parfois accompagné du *Monascus purpureus*, du *Trichoderma viride* et du *Byssosclamyces nivea* (Pelhate, 1975 ; Tsubaki , 1976).

Penicillium roqueforti, est parfois présent sur les raisins (Harwig, et al ,.1978) est un hôte fréquent des caves à vin. Il se développe sur les bouchons de liège des bouteilles d'autant plus facilement lorsque ceux-ci sont recouverts d'une capsule métallique de surbouchage (Moreau,.1978) il ne semble cependant pas altérer les qualités organoleptiques du vin.

Penicillium roqueforti a, en outre, été reconnu contaminant des aliments variés :

- Produits laitiers (crème, beurre, yaourts, etc.) crème glacée .
- Produits céréaliers, riz pain (Tsunoda,.1970 ; Udagawa,et al ,. 1970)
- Produits oléagineux (arachide ...) .
- Produits sucrés, confitures.
- Produits carnés: viande fraîche, jambons, saucissons
- Fruits et légumes, jus de fruits. (Jirkowsky et Galgoczy , 1965 ; Leistner et Ayres ,.1967 ; Racovita et al ,.1969 ; Hadlok et al , 1975 ;Orth , 1976 ;)

Penicillium roqueforti est également capable de se développer sur des substrats divers, tels que des joints de porte de réfrigérateurs (Frank,.1974).

II. Propriétés fonctionnelles du *Penicillium roqueforti* en fromagerie :

II.1 Lipolyse :

Dans le fromage, les acides gras libres sont des précurseurs de nombreux composés aromatiques, tels que les méthylcétones, les lactones, les esters, les alcanes et les alcools secondaires. Diverses voies possibles de dégradation des acides gras sont présentées dans la Figure 3 .

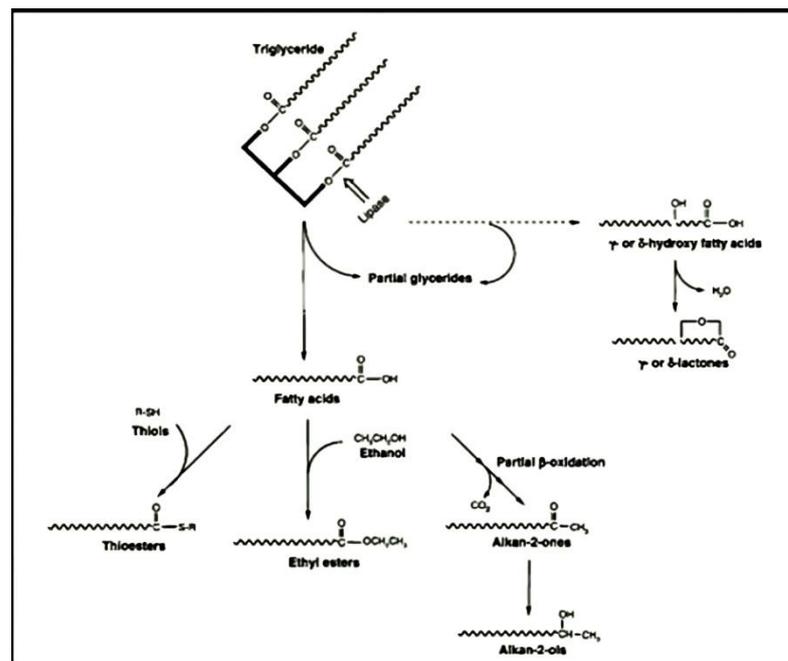


Figure 3 : Voies de dégradation possibles des acides gras (d'après Collins et al., 2004).

Dans les fromages persillés, la dégradation des graisses est particulièrement forte par rapport aux autres fromages (voir tableau 1). Cette dégradation des lipides est principalement due à l'action des enzymes produites par *P. roqueforti* (Kinsella et Hwang, 1976 ; Coghill, 1979; Gobbetti et al., 1997a).

Tableau 1 : Concentrations en acides gras libres (AGL) retrouvées au niveau de certains fromages (adapté de Cantor et al., 2004 ; Martín et Coton, 2015)

Nom de fromage	Concentration en AGL (mg.kg ⁻¹)	Référence
Gamonedo	75 685	González de Llano et al., 1992
Blue (US)	35230	Woo et al., 1984
Cabrales	33153	Alonso et al., 1987
Roquefort	32453	Woo et al., 1984
Danablu	32639	Cantor et al., 2004
Parmesan	13697	de la Fuente et al., 1993
Munster	6260	de León-González et al., 2000
Camembert	5066	de la Fuente et al., 1993
Brie	2678	Woo et al., 1984
Gruyère	1481	Woo et al., 1984
Cheddar	997-1028	Woo et al., 1984
Port Salut	700	Woo et al., 1984
Edam	356	Woo et al., 1984

Penicillium roqueforti produit au moins 3 lipases : deux lipases extracellulaires, une, acide avec un pH optimal de 6,0 et un autre de 2,8 et avec une stabilité maximale entre pH 3,7 et pH 6,0, sa température optimale se situe entre 35 et 40°C mais une activité équivalente à 37% de l'activité maximale a été rapportée à 5°C. L'autre lipase extracellulaire alcaline est active à des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 11,0, avec un optimum entre 8,8 et 9,0 à

30°C et entre 9,0 et 10,0 à 20°C (Lamberet et Menassa, 1983 ; Mase et al., 1995). La troisième lipase produite est intracellulaire (Stepaniak et al., 1980).

Bien que le pH acide des fromages à pâte persillée favorise généralement l'activité de la lipase acide, il faut noter que la lipase alcaline a une activité plus importante sur la matière grasse laitière (Eitenmiller et al., 1970; Lamberet et Menassa, 1983).

Grâce à ses enzymes, *P. roqueforti* domine ainsi la dégradation des lipides au niveau des fromages à pâte persillée même si d'autres agents lipolytiques sont également présents comme *Y. lipolytica* (Cantor et al., 2004).

Il faut, enfin, souligner que l'étude des séquences des génomes de *P. roqueforti* disponibles pourrait permettre d'actualiser les connaissances concernant le potentiel enzymatique et notamment lipolytique de cette espèce.

II.2 Protéolyse et dégradation des acides aminés :

Pour les fromages affinés, la protéolyse est l'activité biochimique la plus complexe et la plus importante qui se déroule durant l'affinage (McSweeney, 2004). Elle contribue à la fois au développement de la texture du fromage et du profil aromatique. En effet, en hydrolysant les caséines qui donnent sa structure au fromage, la protéolyse influence la texture de ce dernier et augmente également la capacité de rétention d'eau du caillé. De même, les peptides formés peuvent avoir un impact direct sur la saveur du fromage, certains étant amers (oligopeptides et hydrophobes) (McSweeney, 2004).

Plus encore, la protéolyse influence grandement les qualités aromatiques en libérant une quantité importante d'acides aminés qui, pour certains, agissent directement sur la flaveur en apportant des notes sucrées (e.g. glycine, sérine, thréonine, alanine, proline), aigres (e.g. histidine, glutamine, asparagine) ou amères (e.g. arginine, méthionine, valine, leucine, phénylalanine, tyrosine, isoleucine, tryptophane) mais qui servent également de précurseurs pour une gamme complète de réactions cataboliques produisant de nombreux composés aromatiques (McSweeney, 2004).

La Figure 4 résume de manière globale l'ensemble des réactions pouvant avoir lieu lors de la protéolyse et du catabolisme des acides aminés.

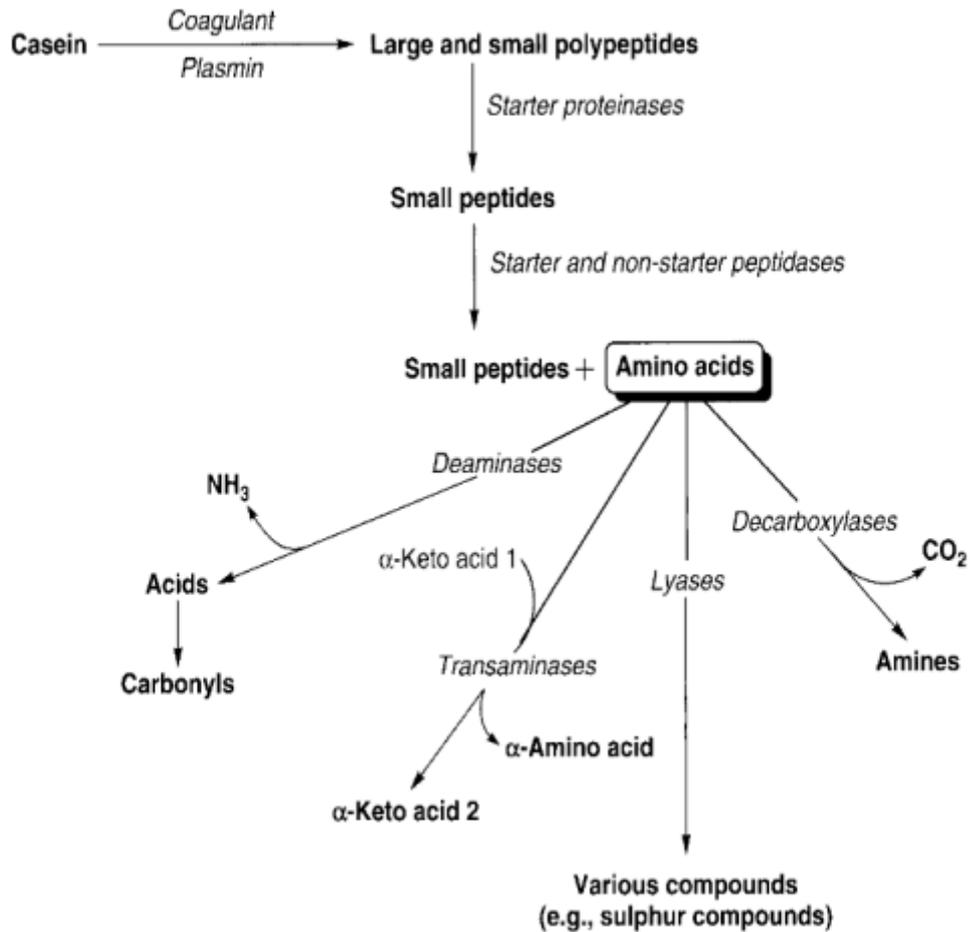


Figure 4 : Voies de dégradation au cours de la protéolyse et du catabolisme des acides aminés durant l’affinage des fromages (d’après McSweeney, 2004).

Au niveau des fromages à pâte persillée, plusieurs études ont révélé que la protéolyse y était plus intense comparativement à d’autres fromages (Marcos et al., 1979; Trieu-Cuot et Gripon, 1983 ; De Llano et al., 1995).

Les enzymes contribuant à la protéolyse dans les fromages à pâte persillée peuvent provenir du lait, de la présure, des bactéries « ferments et autres bactéries », des moisissures et des levures, même si la contribution principale provient de l’activité protéolytique de *P. roqueforti* (Coghill, 1979)

La croissance de *Penicillium roqueforti* est accompagnée de la production d’enzymes intracellulaires et extracellulaires pour le métabolisme des protéines, y compris une protéase aspartique une métalloprotéase qui hydrolyse les β -caséines et les α_{s1} -caséines, une sérine carboxypeptidase extracellulaire qui libère des acides aminés acides, basiques et hydrophobes, et une métalloaminopeptidase extracellulaire qui libère des acides aminés apolaires éloignés des résidus de glycine. Les protéases participant ainsi à la désacidification, aux modifications

de la texture du fromage et à la production d'arômes, car certains composés précurseurs sont libérés (oligopeptides et acides aminés).

Dans les fromages bleus, les protéases peuvent également provenir d'autres sources telles que le lait (par exemple, la plasmine et les peptones protéases) et la présure (qui décompose l' α s₁-caséine pour produire des peptides) ou d'autres microorganismes (bactéries lactiques et autres bactéries), levures et autres espèces de moisissures).

Certaines espèces des ferments comme *Lactococcus spp.* ou *Lactobacillus spp.* participent à l'hydrolyse des peptides produits par la présure et la plasmine avec une libération limitée d'acides aminés pendant les premières semaines de maturation.

La présure est considérée comme le principal complexe enzymatique impliqué dans la dégradation de la caséine avant la croissance de *P. roqueforti*. Cependant, l'activité protéolytique la plus élevée dans le fromage bleu est due aux activités enzymatiques de *P. roqueforti* et est généralement corrélée à la croissance de la moisissure lorsque celle-ci devient réellement visible dans le fromage. Les enzymes protéolytiques de *P. Roqueforti* sont connues pour être très actives.

Dans certains cas, les oligopeptides et les acides aminés libérés peuvent contribuer positivement à l'arôme et au goût mais aussi négativement via la production de goût désagréable, comme l'amertume, si elles ne sont pas correctement surveillées et contrôlées. En effet, *P. roqueforti* sécrète l'aspartyl protéase et des métalloprotéases qui hydrolysent complètement les caséines, libérant ainsi différents peptides, dont les oligopeptides amers.

Il est intéressant de noter que *P. roqueforti* possède également plusieurs exopeptidases et une carboxypeptidase acide extracellulaire qui peuvent être impliquées dans la dégradation des peptides amers ainsi que dans la dégradation d'autres peptides (Martín et Coton.2016).

Le Tableau 2 liste les principales enzymes produites par *P. roqueforti* et impliquées dans la protéolyse et le catabolisme des acides aminés durant l'affinage.

Tableau 2 : Principales enzymes produites par *P. roqueforti* impliquées dans la protéolyse et le catabolisme des acides aminés durant l’affinage (d’après Cantor et al., 2004).

Enzyme	Mode d’action
Aspartyl-protéase	Hydrolyse des β -caséines préférentiellement au niveau des régions (98-209, 30-209, 1-29, 100-209, 197/99) Hydrolyse des α ₁ -caséines
Métalloprotéase	Large spectre d’action
Carboxypeptidase sérine (extracellulaire, acide)	Libération d’acides aminés acides, basiques et hydrophobes
Métalloaminopeptidase (extracellulaire, alcaline)	Libération d’acides aminés apolaires
Carboxypeptidase sérine (extracellulaire, acide)	
Métalloaminopeptidase (extracellulaire, alcaline)	

Enfin, les activités protéolytiques et les niveaux d'enzymes produits parmi les souches de *P. roqueforti* semblent être très variables, ce qui pourrait être un trait important à prendre en compte pour la sélection de souches de ferments ou d'affinage à l'avenir.

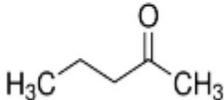
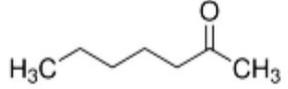
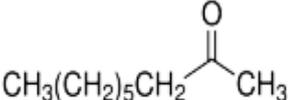
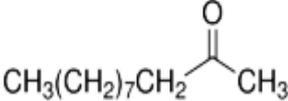
Par rapport aux autres fromages, les fromages bleus subissent une protéolyse importante qui contribue à leur texture et à leur saveur distincte et caractéristique. Cependant, le catabolisme des acides aminés a probablement un impact moindre sur le contenu final de l'arôme que le métabolisme des lipides conduisant à la formation de méthylcétone, les principaux composés volatils détectés dans ce type de fromage (Martín et Coton.2016)

II.3 Production d’arômes :

Une large gamme de composés aromatiques volatiles et non volatiles est donc produite dans les fromages à pâte persillée lors de l’affinage, principalement due à l’action des enzymes de *P. roqueforti*. Cela influence tant le goût que la flaveur du produit final. La variation des proportions de chacun des composés détermine les profils aromatiques des différents fromages à pâte persillée (Gillot , et al ,.2017b). Les saveurs caractéristiques des fromages à pâte persillée proviennent principalement de la dégradation des lipides.

Les acides gras libres contribuent à la fois au goût et à la flaveur, mais plus important encore sont les composés produits à partir de ces derniers, par exemple, les méthyl-cétones, essentiels aux qualités organoleptiques des fromages à pâte persillée (Kinsella et Hwang, 1976; Moio et al., 2000). Les méthyl-cétones sont les composés aromatiques majoritaires dans des fromages à pâte persillée. Elles constituent 50 à 75 % des composés aromatiques volatils totaux dans les fromages à pâte persillée et leur concentration peut être corrélée à l'intensité de la note caractéristique des bleus (Ardö, 2011). En effet, la saveur piquante associée aux fromages à pâte persillée a été corrélée aux concentrations élevées en acides gras libres et particulièrement de leurs produits d'oxydation, les méthyl-cétones (Ratray et Eppert, 2011). Les méthylcétones retrouvées en concentrations les plus importantes sont la 2-heptanone et la 2-nonanone, mais les concentrations en 2-pentanone et 2-undécanone sont également élevées.

Tableau 3 : Structure de quelques méthyl-cétones et leurs niveaux de présence dans différents fromages à pâte persillée (adapté de Spinnler, 2009).

Nom	Structure moléculaire	Quantités (mg.kg ⁻¹)		
		Roquefort	Bleu des Causses	Bleu d'Auvergne
2-pentanone		0,56 à 9,4	3,4	0,34
2-heptanone		3,9 à 13,1	2,9	1,8
2-nonanone		3,9 à 10	1,6	4,5
2-undécanone		0,5 à 1,1	0,45	1,5

La concentration totale de méthyl-cétones dans les fromages à pâte persillée dépend à la fois du processus de fabrication, du temps d'affinage et de la souche de *P. roqueforti* utilisée tandis que les proportions des composés appartenant à cette famille retrouvées dans le fromage dépendent en particulier de la souche de *P. roqueforti* utilisée (Gallois et Langlois, 1990).

Les notes issues des méthyl-cétones sont, en général, fruitées, florales parfois moisies. Plus spécifiquement, le 2-heptanone apporte une note plus épicée et surtout il est caractéristique de la note « bleu » (Cantor et al., 2004). Etant donné que des concentrations importantes en acides gras libres inhibent la croissance de *P. roqueforti* et retardent ainsi la lipolyse, la production de méthyl-cétones à partir d'acides gras libres a été décrite comme un potentiel mécanisme de détoxification (Kinsella et Hwang, 1976).

Les alcools représentent entre 15 et 30 % des composés aromatiques volatils totaux dans les fromages à pâte persillée (Ardö, 2011). Les méthyl-cétones peuvent, en condition anaérobie, être réduites en alcools secondaires. Ces alcools sont généralement plus abondants dans les bleus que les alcools primaires. Les alcools secondaires principaux sont le 2-heptanol, le 2-nonanol et le 2-pentanol, les proportions dépendant grandement de la souche de *P. roqueforti* utilisée (Gallois et Langlois, 1990; Gonzales De Llano *et al.*, 1990). Les alcools primaires sont aussi présents, le 3-méthyl-1-butanol étant généralement le plus abondant.

D'autres composés aromatiques avec des notes fruitées et florales sont retrouvés et appartiennent à la famille des esters et des lactones, ces dernières étant généralement retrouvées en faibles concentrations (Gallois et Langlois, 1990 ; Gonzales De Llano et al., 1990). Il en est de même pour les aldéhydes dont l'impact sur la saveur n'est pas connu.

Les peptides et les acides aminés de la protéolyse apportent également leur contribution à la saveur du fromage, les composés formés ayant des notes variées comme, par exemple, sucrée ou amère. Le Tableau 4 présente les concentrations totales des principaux groupes de composés aromatiques retrouvés au sein de différents fromages à pâte persillée.

Tableau 4 : Concentration totale ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de fromage) des principaux groupes de composés aromatiques retrouvés au sein de différents fromages à pâte persillée (d'après Cantor et al., 2004)

Famille de composés aromatiques	Roquefort (souche PF ^a)	Roquefort (souche PO ^b)	Roquefort (souche PG ^c)	Blue casses (souche PG ^d)	Bleu d'Auvergne ^e
Cétones	11095	14350	34940	9345	9780
Alcools	4025	3305	7670	3795	8110
Esters	1390	2985	3835	3155	2950

Lactones	50	255	325	425	2230
aldéhydes	5	10	15	0	250

Notes :

^a Faibles activités protéolytiques et lipolytiques ; 210 jours d'affinage

^b Fortes activités protéolytiques et lipolytiques ; 210 jours d'affinage

^c Activités protéolytiques et lipolytiques intermédiaires ; 210 jours d'affinage

^d 100 jours d'affinage

^e Approximativement 45 jours d'affinage.

Outre ses activités protéolytiques et lipolytiques menant, entre-autres, à la formation d'arômes volatiles ou non, *P. roqueforti* est également capable de produire une gamme de métabolites secondaires et intermédiaires plus ou moins large selon les souches dont certains sont considérés comme des mycotoxines. Le paragraphe qui suit permettra de faire un point sur ces métabolites secondaires et en particulier concernant les mycotoxines que *P. roqueforti* peut potentiellement produire.

II.4 Pigments

Alors que les veines des fromages bleus sont colorées par les conidies de *P. roqueforti*, la biosynthèse de la mélanine, qui donne la couleur bleue aux conidies, n'est pas entièrement déchiffrée. Des combinaisons d'approches bioinformatiques, biochimiques et génétiques tendent à montrer que *P. roqueforti* produit de la mélanine via une voie dihydroxynaphtalène (DHN) - mélanine utilisant un groupe de gènes contenant six gènes, à savoir *alb1*, *ayg1*, *arp1*, *arp2*, *abr1* et *abr2*, comme on le trouve chez les membres du genre *Aspergillus*. On pense que les mélanines sont importantes pour l'intégrité structurale de la paroi des spores ainsi que pour les résistances multiples au stress. Comme cela a été observé pour d'autres caractéristiques, la pigmentation varie selon les souches et des différences significatives ont été signalées entre les souches utilisées pour différents fromages AOP. (Coton, 2021)

III. Les fromages à pâte persillée :

III.1 Historique :

La légende attribue la naissance du Roquefort à la maladresse d'un berger qui était parti sur les traces d'une bergère en laissant dans une grotte sur le rocher du Cambalou du pain et du fromage de brebis. A son retour, sa nourriture était couverte de moisissures ce qui ne l'a pas empêché de mordre dans le fromage. Il a tellement aimé qu'il en a fait et refait dans ses caves. Ainsi est né le Roquefort. Depuis, ce fromage fait partie du patrimoine culinaire français.

Le village de Roquefort dans l'Aveyron, classé Site Remarquable du Goût est le seul endroit dans lequel on fabrique ce fromage (www.roquefort.fr)

En 1070 apparaît pour la première fois la mention du Roquefort dans les textes carolingiens. L'histoire du roquefort reste ensuite intimement liée à Roquefort-sur-Soulzon et au massif du Combalou grâce au roi Charles VI. Il décide au XV^{ème} siècle et pour la première fois en France d'en octroyer la production exclusive aux habitants de Roquefort, faisant des caves des lieux protégés. Au 18^{ème} siècle, Diderot consacre le roquefort en lui décernant le titre de « Roi des Fromages et fromage des Rois ». En 1925, le roquefort devient le premier fromage reconnu Appellation d'Origine (AO en 1925, puis AOP en 1996). A ce jour, il bénéficie d'une reconnaissance européenne en tant qu'Appellation d'Origine Protégée, qui garantit la provenance d'un produit. (<https://www.roquefort-papillon.com/>, <https://www.roquefort.fr/1ère-aop-de-l'histoire/>)

III.2 Définition normative des fromages à pâte persillée :

La dénomination « Bleu » est utilisée pour un fromage affiné, à pâte légèrement salée, broyée ou non, et présentant des veines et/ou des cavités internes bleues-vertes en raison du développement de moisissures. Les fromages à pâte persillée regroupent un grand nombre de fromages différents, dont beaucoup sont sous AOP : Bleu d'Auvergne, Roquefort, Fourme d'Ambert, Bleu de Gex... (Atalia.eu)

Les fromages à pâte persillée sont fabriqués à partir de lait de vache, de brebis ou de chèvre. Ils ont cet aspect « persillés » à cause du développement de *Penicillium roqueforti* ou *P. glaucum*.

On distingue 3 grandes classes de bleus :

- les bleus forts : pâtes persillées à tendance lactique (Bleu d’Auvergne, Roquefort...).
Texture cassante/friable, bleu très présent et puissant.

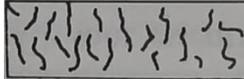
- les bleus doux : pâtes persillées à tendance présure (Bleu de Gex, de Bresse, Gorgonzola...).
Texture souple, peu de bleu, arômes plus doux.

- les bleus intermédiaires : pâtes persillées mixtes (fourmes...) (source : ACTALIA)

III.3 Classification des fromages à pâte persillée :

Les fromages bleus ou à pâte persillée font partie de la famille des pâtes molles (voir tableau 5)

Tableau 5 : Sous-famille des fromages bleus et / ou des pâtes persillées (d’après Mietton 1994 ; Alemena et Mietton ,2014)

	Types de bleu			
	Lactique	Pâtes persillées , bleu		
		Mixte : type 1 Traditionnels français	Mixtes : type 2 Danois et autrichiens	Présure Indiens
Aspect	Moisissures uniquement en surface			
Pâte	- Dense - Compacte - Crayeuse	- Pâte ± sèche - Avec d'importantes ouvertures mécaniques	- Pâte ± sèche	- pâtes très douce
Ouvertures	Absence d'ouverture	Grosses cavités avec zone périphérique non fleurie	Petites cavités uniformément réparties	Veines longitudinales perpendiculaires à la surface , avec de légères ramification
Couleur des moisissures	- vert foncé - brun foncé	-couleur principalement foncées : vert , bleu , gris et brun	- vert foncé - vert brillant - bleu clair	- bleu clair - bleu brillant
B.lactique Lactocoques	++ : (1-2%)	++ : (1-2%)	++ : (1-2%)	--ou(+) :(0.2-0.5%)
Leuconostocs	-	+	+	- ou (+)
S.thermophilus	-	-	+: (0.5-1%)	++ : (1- 2 %)

Lb.Delbueckii ssp .Bulgaricus	-	-	-	+
Levures utilisées	absence	Kluyveromyces lactis	Sach. cereviacieae ou kluyveromyces lactis	Absence ou Sach. cereviacieae
Homogénéisation lait	Absence	Absence	Partie de la MG	Partie du lait ou de la MG
Coagulation T°C		28-32	29-31	29-35
pH		6.45-6.5	6.45-6.50	6.40-6.50
[Coagulant]		15-30	2030	20-25
Temps total		30 - 120 min	70-100 min	20-30min
Travail en cuve - Décaillage		2 – 5 cm	1.25-3 cm	2.5-4 cm
- Brassages		-Brassage et repos alternés	-Brassage et ropos alternés	-Brassage et ropos alternés
-Retrait lactosérum		-10-30% au moulage	-30-40% au moulage	- 30% au moulage
- Durée		- 30-45 min	- 55-60 min	- 20-35 min
Pré-égouttage		Avant moulage , pré-égouttage sur table avec toile ,ou sur grille ou tapis		
Démoulage G/S	-	> 50%	>50%	> 50 %
HFD	66-70	67-69 %	66-68%	68-69 %
Ca_T/ESD	<1.5	1.8-1.9%	1.8-2%	1.9 -2.3%
pH	-	4.8-4.9	4.85-4.95	4.9-5.05
NaCl/H₂O (affiné)	<2.5	4.5-7.5%	4-5%	2.8-3.2 %
Exemple	-classic B.log -blue bonnet -monte enebro	- Roquefort - Cabrales (E) - Bleu des causses -Bleu d'Auvergne -Fourme d'Ambert -Bleu des laqueille -Bleu des Aravis - Saint-Agur	- Danablu (Dk) -Bleu bavarois (D) -Bleu autrichien -Stilton (GB)	- Gorgonzola (I) - Bleu de Sassenage ou bleu du Vercors - Bleu de Gex ou bleu du Haut jura -combozola

On distingue les grandes classes de bleus (mixtes de type 1, traditionnels français ; mixtes de type 2 danois et autrichiens et les bleus présure dits italiens essentiellement par leur aspect à la coupe (ouverture , réparation du bleu) et leur texture: . (Mietton , Chablain , 2016)

Les bleus traditionnels français ont une importante ouverture mécanique, une couleur de *P.roqueforti* plus ou moins foncée et une pâte plus ou moins sèche.

Les bleus de type danois ont de petites cavités uniformément réparties, un *penicillium* allant du clair au foncé et une texture de pâte plus ou moins sèche.

Les bleus de type italien n'ont normalement pas d'ouverture mécanique. Ils présentent des veines de bleu longitudinales, perpendiculaires à la surface avec de légères ramifications, le bleu ne se développant que dans les cavités créées lors du piquage, la texture de pâte est très douce et facilement tartinable. (Mietton et Chablain, 2016)

Les technologies mises en œuvre pour obtenir chacun des groupes utilisent des ferments lactiques, des souches de *P.roqueforti* et des levures spécifiques. L'acidification des bleus mixtes est due à l'emploi de lactocoques, tandis que *S. thermophilus* intervient dans le groupe présure. Les leuconostocs, utilisés dans les technologies mixtes et associés aux levures (*K. lactis* ou *Sach. cerevisiae*) ont un rôle essentiel dans la formation et le maintien de l'ouverture pour le développement de *P.roqueforti* après piquage. L'emploi spécifique de *Lb. bulgaricus* dans le groupe présure permet une protéolyse primaire plus intense, pour partie responsable de leur texture crémeuse. L'homogénéisation est souvent appliquée selon diverses modalités dans les groupes mixtes 2 et présure, pour assurer la blancheur de la pâte et favoriser le catabolisme de la matière grasse lors de l'affinage surtout si les laits sont pasteurisés (destruction de la lipoprotéine lipase native). Lors de la coagulation, pour des pH voisins de 6.4-6.5 et des doses de présure comparables, la température d'emprésurage augmente pour passer de 28-32°C pour le groupe mixte 1 à 29-35°C pour le groupe présure. Logiquement, les temps totaux de coagulation sont diminués, de 30 à 120 minutes pour le groupe mixte 1 et de 20 à 30 min pour le groupe présure. Comparativement aux pâtes molles non persillées, la durée de la coagulation totale est plus longue, le travail en cuve et le soutirage partiel de lactosérum favorisent le « coiffage » du grain afin d'obtenir l'ouverture mécanique recherchée. (Mietton, Chablain, .)

III.4 Composition et valeur nutritionnelle des fromages à pâte persillée :

100 grammes de fromage bleu ont une valeur énergétique moyenne de 374 calories ou kilocalories (ou 1550 kilojoules). En moyenne, les produits de la catégorie fromages à pâte persillée apportent une valeur énergétique équivalente à 353 kilocalories. 20g en protéines, 2 g de glucides et 36 g de lipides (voir Figure 5):

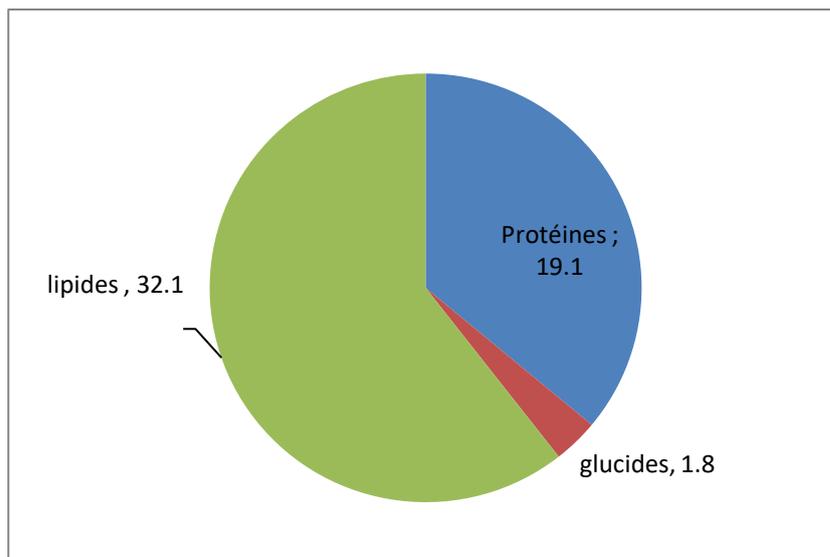


Figure 5: teneur en protéines, glucides et lipides pour 100 g du fromage à pâte persillée (d'après CIQUAL-Anses, 2014)

Dans le cas du roquefort, une composition détaillée est donnée par le tableau 6

Tableau 6 : Composition nutritionnelle détaillée du roquefort (d'après l'ANSES)

	Teneur moyenne	Min	Max	Sources de données
Energie, (kJ/100 g)	1590			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciquál
Energie, (kcal/100 g)	384			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciquál
Energie, N x facteur Jones, avec fibres (kJ/100 g)	1600			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciquál
Energie, N x facteur Jones, avec fibres (kcal/100 g)	386			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciquál
Eau (g/100 g)	41,9	39,4		Analyses Ciquál 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Protéines, N x facteur de Jones (g/100 g)	19,5	19,4	21,5	Analyses Ciquál 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Protéines, N x 6.25 (g/100 g)	19,1	19	21,1	Analyses Ciquál 2017 MS-2.6 Données industrielles françaises (2014)
Glucides (g/100 g)	traces			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciquál
Lipides (g/100 g)	33,9	30,6		Analyses Ciquál 2017 MS-2.6 Données industrielles françaises (2014) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Sucres (g/100 g)	traces			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6 Données industrielles françaises (2014)
Fructose (g/100 g)	< 0,1			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6
Galactose (g/100 g)	< 0,1			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6
Glucose (g/100 g)	< 0,1			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6
Lactose (g/100 g)	< 0,1			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6
Maltose (g/100 g)	< 0,1			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6
Saccharose (g/100 g)	< 0,1			Analyses Ciquál 2017 MS-2.6
Amidon (g/100 g)	0			(Holland <i>et al</i> ., 1989).

				SA des caves et producteurs réunis de Roquefort (1998). Rapport de laboratoire.
Fibres alimentaires (g/100 g)	0			Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Données industrielles françaises (2014) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Polyols totaux (g/100 g)	0			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciqual
Cendres (g/100 g)	5,1		6,44	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Alcool (g/100 g)	0			Valeur ajustée/calculée/imputée Ciqual
Acides organiques (g/100 g)	0,93			Analyses Ciqual 2017 MS-2.6
AG saturés (g/100 g)	24,9	19,3		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011). Données industrielles françaises (2014) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG monoinsaturés (g/100 g)	5,88		8,47	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG polyinsaturés (g/100 g)	0,84		1,32	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 4:0, butyrique (g/100 g)	1,19	0,88		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 6:0, caproïque (g/100 g)	1,04	0,66		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 8:0, caprylique (g/100 g)	1,08	0,67		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 10:0, caprique (g/100 g)	2,6	2,16		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 12:0, laurique (g/100 g)	1,7	1,28		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011). USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 14:0, myristique (g/100 g)	4,27	3,25		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011). USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 16:0, palmitique (g/100 g)	9,07	6,57		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011). USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 18:0, stéarique (g/100 g)	2,95		3,14	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
AG 18:1 9c (n-9), oléique (g/100 g)	5,28	4,95		Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011).
AG 18:2 9c,12c (n-6), linoléique (g/100 g)	0,52		0,59	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011).
AG 18:3 c9,c12,c15 (n-3), alpha- linoléique (g/100 g)	0,23		0,26	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Calculs Ciqual (2011).

AG 20:4 5c,8c,11c,14c (n-6), arachidonique (g/100 g)	0,02			Analyses Ciqual 2017 MS-2.6
AG 20:5 5c,8c,11c,14c,17c (n- 3) EPA (g/100 g)	0,02			Analyses Ciqual 2017 MS-2.6
AG 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c (n-3) DHA (g/100 g)	< 0,01			Analyses Ciqual 2017 MS-2.6
Cholestérol (mg/100 g)	74,7		90	Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Sel chlorure de sodium (g/100 g)	3,22	2,85	4,55	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Données industrielles françaises (2014) Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009
Calcium (mg/100 g)	660	548	771	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Chlorure (mg/100 g)	2600	2130	2850	Holland B, Unwin ID, Buss DH (1989). Milk Products and Eggs. Fourth supplement to McCance and Widdowson's The Composition of Foods, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 146p. SA des caves et producteurs réunis de Roquefort (1998). Rapport de laboratoire.
Cuivre (mg/100 g)	0,024		0,034	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Fer (mg/100 g)	0,1		0,56	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Iode (µg/100 g)	51,2	50	52,3	Inra Theix (1995). Rapport de laboratoire. Valeix (2004). Table iode.
Magnésium (mg/100 g)	31,9	30	32,8	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Manganèse (mg/100 g)	0,019	0,018	0,03	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Phosphore (mg/100 g)	392			USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Potassium (mg/100 g)	115	78,3	151	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Sélénium (µg/100 g)	< 10			Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009
Sodium (mg/100 g)	1290	1140	1820	Analyses Ciqual 2017 MS-2.6 Données industrielles françaises (2014) Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009
Zinc (mg/100 g)	1,83	1,79	2,08	Etude de l'alimentation totale, 2e édition, 2009 USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Rétinol (µg/100 g)	212		290	Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine E (mg/100	0,12			Composition fine du lait et des fromages de brebis,

g)				document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008)
Vitamine C (mg/100 g)	0			USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B1 ou Thiamine (mg/100 g)	0,044	0,04		Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B2 ou Riboflavine (mg/100 g)	0,67	0,59		Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B3 ou PP ou Niacine (mg/100 g)	0,73			USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B5 ou Acide pantothenique (mg/100 g)	0,62		1,73	Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B6 (mg/100 g)	0,081		0,12	Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B9 ou Folates totaux (µg/100 g)	29,1		49	Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl
Vitamine B12 (µg/100 g)	0,57		0,64	Composition fine du lait et des fromages de brebis, document de synthèse, Programme mené dans le cadre du Comité Lait de Brebis de l'office de l'Elevage (2008) USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014), http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl

❖ **Additifs alimentaires autorisés dans le Roquefort et les fromages à pâte persillée.**

La réglementation est stricte quant à l'utilisation d'additifs alimentaire dans le roquefort., le Tableau 8 donne la liste des additifs alimentaires et leur teneur autorisée pour 100 g du roquefort / fromage à pâte persillée

Tableau 7 : la teneur des additifs alimentaires pour 100 g du roquefort / fromage à pâte persillée (d'après l'ANSES)

Additif alimentaire	: teneur pour 100 g de Roquefort	Fromages à pâte persillée :
Polyols	0,0 g	0,0 g
Acides organiques	0,9 g	0,9 g

III.5 Les étapes de fabrication des fromages à pâte persillée

En général, les fromages à pâte persillée sont fabriqués selon le procédé illustré par la figure 6.

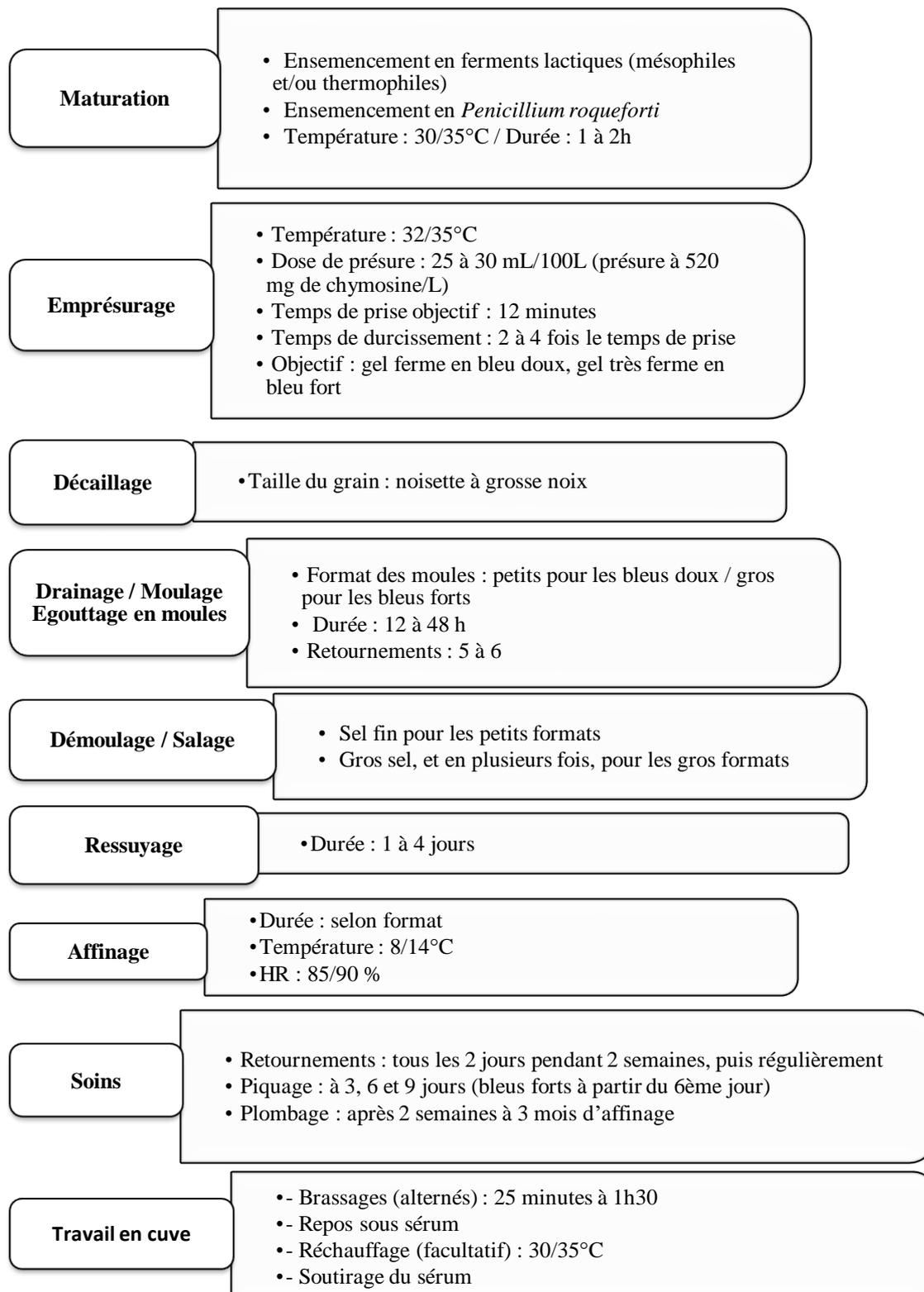


Figure 6 : schéma de fabrication du fromage à pâte persillée (Source : ACTALIA)

III.5.1 Le roquefort :

III.5.1.1 Présentation du fromage :

Le Roquefort est le plus célèbre des fromages bleus français et porte le nom du petit village de Roquefort qui se trouve sur une montagne calcaire, appelée le Combalou, entre l'Auvergne et le Languedoc dans la région de l'Aveyron. (GiuseppeLicitra *et al* ,2019)

Le Roquefort est un fromage au lait cru et entier de brebis, a pâte persillée et a croûte naturelle , il a une forme cylindrique de 19 à 20 cm de diamètre , 8.5 à 11.5 cm de hauteur , et dont le poids varie entre 2.5 et 3 kilogrammes . il est toujours commercialisé dans une feuille de papier d'aluminium , produit exclusivement dans une grande partie du département de l'Aveyron et quelques communes des départements de l'Aude , la Lozère , le Gard , l'Hérault et le Tarn en région Occitanie .

(source : le guide du fromage)

Le fromage de Roquefort bénéficie d'une appellation d'origine depuis 1925 (la première en France), d'une Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) depuis 1979, et d'une AOP depuis 1996, dans toute l'Union européenne. (GiuseppeLicitra , *et al* ,.2019)



Figure 7 : Aspect interne du fromage Roquefort

<https://www.roquefort.fr/>

L'appellation d'origine contrôlée "Roquefort", reconnue par la loi du 26 juillet 1925 est réservée aux fromages répondant selon les usages locaux, loyaux et constants aux conditions fixées par le décret français du 22 janvier 2001 relatif à l'appellation d'origine contrôlée "Roquefort".

Le fromage bénéficiant de l'appellation d'origine contrôlée "Roquefort" est un fromage fabriqué exclusivement avec du lait de brebis mis en œuvre à l'état cru et emprésuré, de forme cylindrique de 19 à 20 cm de diamètre et de 8,5 à 11,5 cm de hauteur, d'un poids de 2,5 à 3 kg, à pâte persillée,ensemencée avec des spores de *Penicillium roqueforti*, non pressée, non cuite, fermentée et salée, à croûte humide, renfermant au minimum 52 g de matière grasse pour 100 g de fromage après complète dessiccation et dont la teneur en matière sèche ne doit pas être inférieure à 55 g pour 100 g de fromage. La durée d'affinage est de 3 mois minimum (dont 14 jours au moins à nu dans les caves naturelles de Roquefort).

Le lait cru et entier provient de brebis de race Lacaune, élevées traditionnellement avec une alimentation à base d'herbe, de fourrages et de céréales provenant au moins à 75% de l'aire géographique de production.

La zone de production du Roquefort comprend les départements de l'Aude, de l'Aveyron, du Gard, de l'Hérault, de la Lozère et du Tarn. (<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000768632/>, NAO et Profession fromager n°24 novembre - décembre 2006)

III.5.1.2 Les étapes de fabrication du Roquefort

Le lait de brebis arrive tous les jours à la fromagerie. Il y est stocké 24 heures à une température maximale de 7/8°C . Il est analysé pour répondre aux besoins de conformité et de traçabilité. Le process est décrit ci-dessous.

III.5.1.2.1 Homogénéisation du lait :

Cette étape consiste à réduire la taille des globules gras en minuscules particules avec une modification de leurs membranes et n'auront plus la capacité de s'assembler pour remonter à la surface. Sur le plan sensoriel, les conséquences de l'homogénéisation sont nombreuses ; elles peuvent influencer la texture, la saveur et l'apparence (Nair 2000; Madadlou et al. 2007).

III.5.1.2.2 Caillage et brassage :

Pour les fromages à pâte persillée, la coagulation est de type mixte. Le lait va êtreensemencé avec la moisissure *Penicillium roqueforti*, puis sont ajoutées les bactéries lactiques et ensuite la présure.

III.5.1.2.3 Egouttage :

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH et aw) et chimique du caillé et par conséquent l'affinage du fromage (Weber, 1997).

Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécanique et thermique, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matière grasse) (Ramet 1987 et 1997)

III.5.1.2.4 Salage :

Le sel va jouer sur les propriétés organoleptiques des fromages et plus particulièrement sur la texture et la saveur (Paulson et al. 1998; Pastorino et al. 2003; Saint-Eve et al. 2009)

Le chlorure de sodium ou plus généralement le sel a de nombreuses fonctions et exerce d'importants effets sur le fromage . Le sel a un rôle au niveau biochimique, microbiologique et organoleptique (Fox et al. 1996) :

Il joue un rôle déterminant sur l'activité de l'eau en abaissant l'eau disponible

Il exerce ainsi un pouvoir sur l'activité microbiologique et sur l'activité enzymatique Il joue un rôle dans les changements biochimiques durant l'affinage (Pastorino et al. 2004)

Il intervient également sur le développement des arômes et des saveurs et également sur la texture des fromages.

Deux types de salage existent :

Le saumurage dont le principe est d'immerger, selon un temps donné, le fromage dans une saumure saturée en sel.

Le salage à sec par saupoudrage, par frottement ou par incorporation du sel dans la masse du caillé.

Dans le cas des fromages à pâte persillée, les deux types de salages peuvent exister. Quand le fromage est immergé dans une saumure, un mouvement des ions Na^+ et Cl^- de la saumure à l'intérieur se crée, conséquence de la différence de la pression osmotique entre le cœur du fromage et la saumure. Par ailleurs, l'eau et les autres éléments solubles se dirigent, en contre sens, de la solution la moins concentrée à celle la plus concentrée, ce qui rétablit l'équilibre de la pression osmotique (Guinee 2004).

III.5.1.2.5 Piquage :

Ce procédé a été inventé en 1873 par Étienne Coupiac (voir l'histoire du roquefort). Le nombre d'aiguilles est variable – entre 35 et 55 – selon la saison et les recommandations des affineurs. Le piquage va oxygéner le fromage et ainsi permettre un bon développement du *penicillium*. Les pains sont piqués et expédiés ensuite dans les caves. (Bord, 2015)

III.5.1.2.6 Affinage :

C'est un processus biochimique complexe et long qui correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé par les différents agents (Jany et al., 2008).

Le fromage devient donc le siège de différentes dégradations qui s'effectuent simultanément ou successivement aboutissant à la libération de substances sapides et odorantes en même temps que la modification de la texture (Choisy et al., 1997 a).

Trois grands processus vont prédominer au cours de l'affinage : la fermentation du lactose en lactate, la lipolyse et la protéolyse (Fox et al. 1996; McSweeney 2004).

Durant l'affinage, le complexe enzymatique du *Penicillium roqueforti* va être en grande partie responsable de l'activité protéolytique et lipolytique et du développement de la flaveur des fromages « Bleu» (Sousa 2001). En effet, le *Penicillium roqueforti* présente des systèmes protéolytiques et lipolytiques très complets(Le Bars et Gripon 1981)

III.5.1.2.7 Emballage et la maturation :

Quand l'affineur estime que le développement du *Penicillium roqueforti* au sein du fromage est suffisant, les « pains » sont emballés et conservés dans des salles à basse température pour poursuivre leur lente maturation. Le fromage est affiné et mûri pendant une période minimale de quatre-vingt-dix jours à compter de son jour de fabrication.



Figure 8 : Les étapes de fabrication du roquefort AOP telles qu'elles se déroulent à la Société Fromagère de Saint-Affrique (Anonyme, 2015) .

Deuxième partie :
Partie expérimentale

IV. Matériels et méthodes :

IV.1 Méthodes :

IV.1.1 Production de spores de *P. roqueforti* :

La moisissure est prélevée par écouvillonnage dans les cavités d'un roquefort commercial (Roquefort Société) etensemencée sur du pain d'orge bien cuit, découpé en miettes et humidifié par l'aspersion d'eau distillée (Voir figure 9).

Les miettes de pain ainsiensemencées sont mises à incuber dans un papier aluminium. L'incubation est réalisée à température ambiante, dans une chambre humide pendant 5 à 7 jours.

La culture de moisissures est observée tous les deux jours jusqu'à l'apparition de mycélium bien développé de *P. roqueforti*.



Figure 9 : Fromage et pain d'orge utilisés pour l'isolement et la culture des spores de *P. roqueforti*

IV.1.2 Analyse physico-chimique du lait matière première :

IV.1.2.1 Mesure du pH :

Le pH est une mesure de l'activité des ions (H⁺) contenus dans une solution sa valeur est un indicateur de l'état de fraîcheur ou sur la stabilité de lait mesuré à l'aide d'un pH- mètre à une température de 20 C°. L'électrode est plongée dans le lait et on lit de la valeur du pH stabilisée.

IV.1.2.2 Détermination de l'acidité titrable :

Dans un bécher, on prend 10 ml du lait, on lui ajoute 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine. On ajuste la burette qui contient la soude NaOH N/9 (soude Dornic). La soude est versée jusqu'au virage au rose clair persistant quelques instants et la lecture correspond a la chute de burette

IV.1.2.3 Méthode volumétrique (titrage avec NaOH 0,111 N ou N/9).

L'acidité est la résultante de l'acidité naturelle du lait (liée à sa richesse en protéines et minéraux) à laquelle vient s'ajouter l'acidité développée grâce à l'action de bactéries comme les bactéries lactiques qui transforment le lactose du lait en acide lactique.

C'est un bon indicateur du degré de conservation du lait. Moins un lait est frais, plus il contient d'acide lactique.

- **But :** mesure de la quantité d'acide lactique dans le lait
- **Principe :** réaction de base mesure du point de neutralisation grâce à un indicateur coloré (la phénolphtaléine)

Avant d'effectuer le test, le lait doit être homogénéisé, c'est-à-dire qu'il doit être secoué ou bien mélangé,

➤ **Matériel**

- ✓ Burette graduée en 0,05 ml ou en 0,1 ml permettant d'apprécier la demi-division.
(La burette peut être remplacée par un acidimètre Dornic).
- ✓ Becher de 100 ml.
- ✓ Pipette à lait de 10 ml. -
- ✓ Agitateur.

➤ **Réactifs**

- ✓ Solution titrée d'hydroxyde de sodium (soude) 0,111 N (N/9). Cette solution est dite soude Dornic. On peut la préparer en diluant à 1000 ml, 4,4 g de NaOH anhydre.
- ✓ Solution de phénolphaléine à 1% dans l'éthanol à 95%.

➤ **Procédure**

- ✓ Introduire dans le bêcher 10 ml de lait avec la pipette à lait.
- ✓ Ajouter dans le bêcher 3-4 gouttes de la solution de phénolphaléine.
- ✓ Titrer par la solution de soude jusqu'à début du virage au rose, facilement perceptible par comparaison avec un témoin prélevé sur le même lait. ***La coloration disparaît progressivement et doit persister pendant au moins 30 secondes.***

➤ **Expression des résultats**

L'acidité du lait peut s'exprimer ainsi

$$V_A \times N_A = V_B \times N_B$$

1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par Litre de lait.

La densité du lait est le rapport entre la masse d'un volume de lait et celle d'un même volume d'eau à +20°C.

Elle est déterminée par thermolactodensimètre (le lactodensimètre et le thermomètre sont également utiles) et pycnomètre.

Selon l'A.I. du 18/08/1993, la densité du lait doit se situer entre 1,030 et 1,034 pour répondre aux exigences algérienne

• **Matériaux**

- 1) Lactodensimètre gradué à 0,0005 et étalonné par rapport à l'eau à +20°C.
- 2) Thermomètre à mercure gradué en degré centésimaux
(Ces deux appareils peuvent être remplacés par un thermolactodensimètre).
- 3) Eprouvette de 200 à 250 ml dont les dimensions sont telles qu'elles permettent le libre mouvement du lactodensimètre et l'immersion totale de la tige graduée.
- 4) Bain marie à température réglable pouvant recevoir l'éprouvette précédente (pour réchauffer éventuellement le lait et ramener sa température aux environs de +20°C)

- **Procédure**

- 1) Agiter légèrement l'échantillon par retournement du flacon de prélèvement tout en évitant l'incorporation de bulles d'air dans le lait.
- 2) Un échantillon de lait est transféré lentement dans l'éprouvette tenue inclinée pour éviter la formation de mousse et la remplir jusqu'à débordement ou jusqu'à ce que le thermolactodensimètre puisse être immergé.
- 3) Placer l'éprouvette sur un plan horizontal
- 4) Introduire le thermomètre et attendre que la colonne de mercure se stabilise et lire la température (elle doit être aux environs de 20°C)
- 5) Plonger doucement le lactodensimètre (ou thermolactodensimètre) dans le lait en lui donnant un mouvement de rotation en l'empêchant de toucher ou de reposer sur les parois de l'éprouvette et attendre sa stabilité. Il doit flotter librement.
- 6) Attendre que la colonne de mercure du thermolactodensimètre se stabilise et lire le thermomètre et les degrés lactométriques, en tenant compte de la partie supérieure du ménisque qui se forme.

La lecture s'entend à 20°C, une variation de plus ou moins 5°C dans l'échantillon étant acceptable pour pouvoir corriger la lecture. La densité du lait est exprimée en degrés lactodensimètres (°L) à 20 °C.

- **Expression des résultats**

Pour les températures différentes de 20°C, la correction suivante est nécessaire :

- ✓ Température supérieure à 20°C ; correction additive de 0,0002 par degré au-dessus de +20°C.
- ✓ Température inférieure à +20°C ; correction soustractive de 0,0002 par degré au-dessus de +20°C.

IV.1.2.4 Test d'antibiotique :

On met le milieu de culture (le β ta s.t.a.r Combo) dans le four microonde à 47.5°C pendant 2 min après l'ajoute à l'aide d'une micropipette 200 μ L de lait et on règle l'appareil à 3 min. La lecture des résultats se fait par des bandelettes où la présence de deux trait signifie un résultat positif et la présence de trois traits indique un résultat négative.

IV.1.3 Coagulation et obtention du caillé :

- 1. On commence par le traitement thermique du lait de vache cru aux barèmes proche de la pasteurisation (75 à 80°C pendant quelques minutes). Cette opération consiste à détruire toutes les bactéries pathogènes que l'on peut trouver dans le lait.
- Ensuite, rapidement, on refroidit à 35°C en l'agitant dans un bain marie (d'eau fraîche)
- Des ferments mésophiles sont alors ajoutés : il s'agit de ferments utilisés pour la fabrication du L'ben (Ch Hansen CHN11), et du *Penicillium roqueforti* (suspension en eau distillée)
- Du chlorure de calcium (solution de 50%) est ajouté à la concertation finale de 0,6 à 1 mg de CaCl₂ par litre. A cette étape, on ajoute la présure en poudre de force 1400 IMCU/g à la concentration de 15 à 30 mg/L de lait
- Suivi du caillage : À cette étape de la fabrication, la coagulation est suivie par l'observation de deux paramètres le temps de prise généralement de 10 à 15 minutes et le temps de fermeté du caillé généralement 35 à 45 minutes.
- Une fois le caillé ferme obtenu, il est tranché au couteau en petits cubes. le coagulum est délicatement brassé à la main. Le lactosérum est séparé du caillé
- Une fois ce processus terminé, le caillé estensemencé avec *Penicillium roqueforti* .
- On procède au moulage pour avoir la forme finale du fromage. Vient alors l'étape importante de l'égouttage. En effet, la qualité du fromage dépend de ce dernier.
- Après trois retournements, les fromages sont piqués par une sonde en inox 'un thermomètre ou tiges pour brochettes.
- Au deuxième jour, on laisse le fromage se ressuyer t on procède au salage en saumure
- Au troisième jour on met le fromage dans un réfrigérateur réglé au minimum et dont la température était d'environ 13°C.
- Enfin, après toutes ces étapes vient l'affinage. En industrie, Il se fait dans une pièce ventilée pour permettre au *Penicillium roqueforti* de se développer. Dans mon cas, l'affinage a eu lieu dans un réfrigérateur et a duré une vingtaine de jour.

IV.1.4 Analyses sensorielles :

Les tests sensoriels consistent à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes des sens : la vue, le toucher, l'ouïe, l'odorat, et le goût.

D'après Roudaut et Lefranc(2005), l'analyse sensorielle est un passage obligatoire pour les Industriels du marché agroalimentaire. En effet, cette technique vise la satisfaction des

besoins du consommateur tout en réduisant les pertes aussi bien pour le fabricant que pour le revendeur. Ainsi, selon le type, l'évaluation sensorielle peut avoir comme objectifs :

- La description objective d'un produit pour établir un profil sensoriel.
- L'étude de la satisfaction des consommateurs et/ou de leurs préférences.

Un jury de 30 personnes a participé aux tests organoleptiques, parmi eux, des hommes et des femmes, d'une tranche d'âge de 18 à 60 ans.

Pendant la dégustation lorsque le jury passe d'un échantillon à un autre, ils doivent se rincer la bouche avec de l'eau afin d'enlever le goût de l'échantillon précédent.

IV.1.4.1 Test hédonique :

Il existe plusieurs tests sensoriels, le test hédonique a été choisi puisqu'on cherche à mettre en évidence des préférences.

Le test hédonique a été appliqué pour 4 caractères : l'acidité, le goût, l'arôme et la texture.

Une fiche a été remise aux dégustateurs (voir en annexe) pour qu'ils remplissent l'intensité du caractère.

Les réponses ont été regroupées dans un tableau pour le calcul de la moyenne,

La moyenne a été calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{(X_1 + X_2 + \dots + X_n)}{(n)} = \frac{1 \sum X_j}{n}$$

IV.1.4.2 Profil sensoriel :

Déterminer un profil sensoriel consiste à synthétiser sur une fiche l'ensemble des informations dégagées par l'analyse du produit (Mekkaoui, 2016). Ainsi pour chaque produit, on procède à l'analyse selon les descriptions tout en évaluant l'intensité d'un descripteur sur une échelle graduée.

V. Résultats et discussion :

V.1 Résultats des analyses physico-chimiques du lait

Les résultats d'analyse physico chimique du lait que j'ai utilisé sont résumés par le tableau 11:

Tableau 8 : Résultats des tests physico-chimiques du lait de vache cru utilisé pour la fabrication du fromage bleu

Test	Résultat
pH	6 , 6
Acidité titrable	16° D
Masse volumique	1030 g/l
Présence d'antibiotique	Négatif

V.2 Obtention des spores de *P. roqueforti*

La figure 12 montre l'aspect du pain d'orge en miettes *avant et après production des mycelia et spores de P. roqueforti*.

A l'examen microscopique, on peut noter la ramification du conidiophore suivie de plusieurs branches de métules qui, elles, portent les phialides. Ces dernières présentent l'aspect de bouteilles allongées à l'extrémité des conidiophores; elles sont aussi appelées sporocystes, elles bourgeonnent et libèrent les conidies. Au microscope optique et à objectif X100, on distingue bien les différentes parties du conidiophore et les phialides libérant les conidiospores (conidies). La colonisation des milieux se fait par la croissance mycélienne

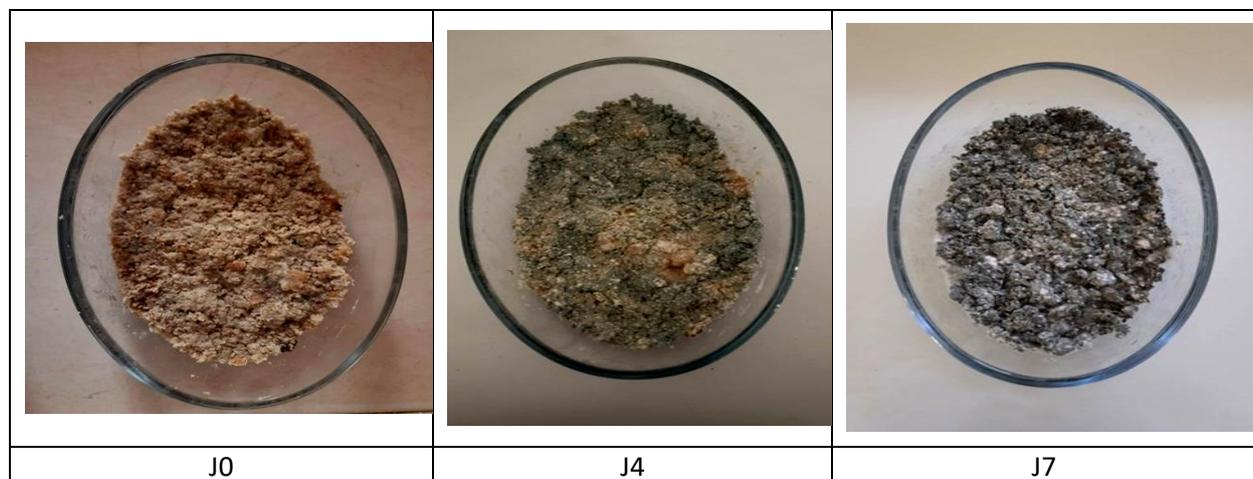


Figure 9 : Aspect du pain d'orge en miettes avant et après sporulation de *P. roqueforti*

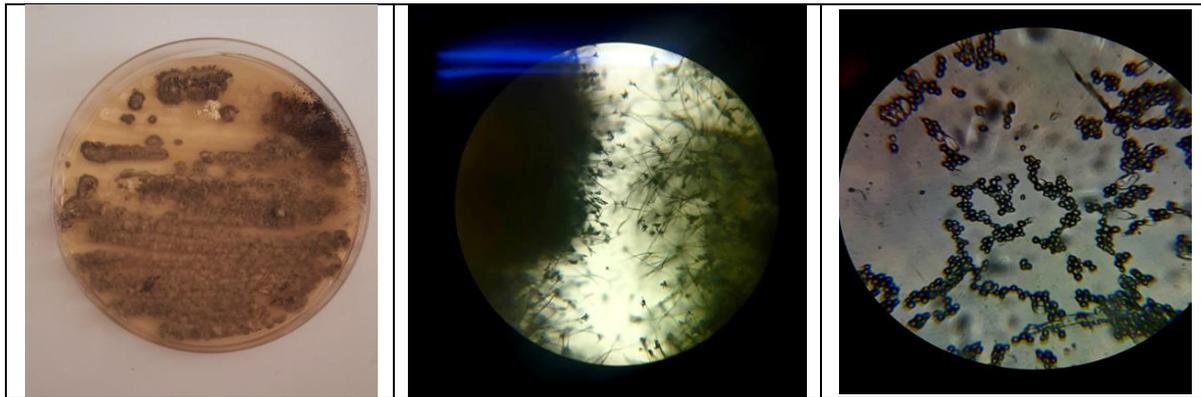
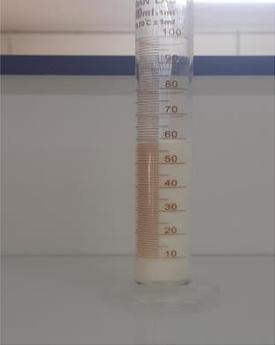


Figure 10 : Observation macroscopique et microscopique de *Penicillium roqueforti*

V.3 Obtention du fromage

Les étapes d'élaboration du fromage sont illustrées par la figure 12 ci-dessous

		
<p>Traitement thermique du lait (chauffage puis refroidissement)</p>	<p>Ferments mésophiles utilisés</p>	<p>Découpage du caillé et repos sous sérum</p>
		
<p>Moulage et égouttage</p>	<p>Aspect du fromage après trois retournements</p>	<p>Aspect du fromage démoulé</p>
<p>Figure 11 : les étapes de fabrication du fromage bleu</p>		

Pour son affinage, le fromage une fois obtenu a été mis dans un réfrigérateur réglé au minimum (vers 13-14°C) et saturé en humidité. Il a été suivi pendant 21 jours avant sa dégustation.

L'aspect externe du fromage durant la période d'affinage est illustré par la figure 13.





Figure 12: Aspect du fromage et développment du P.roqueforti pendant 21 jours

Résultat du test sensoriel

Les résultats du test hédonique sont schématisés sur un profil sensoriel qui détermine la moyenne d'intensité des différentes caractéristiques de fromage bleu étudiées : acidité, odeur, gout, texture

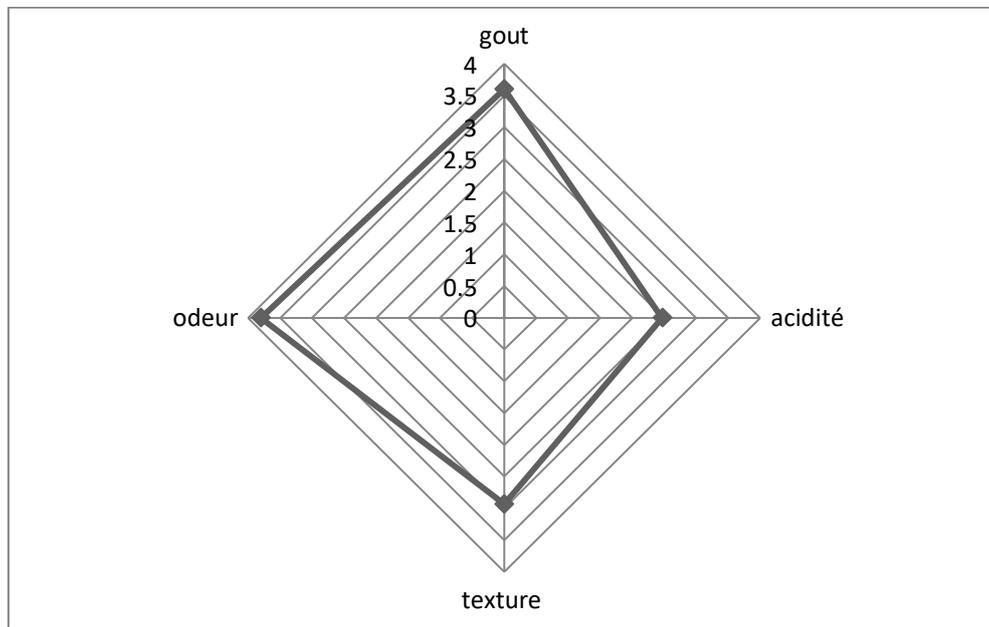


Figure 13 : profil sensoriel du fromage

Conclusion générale :

Le premier objectif de notre travail a été d'essayer de produire de manière artisanale des spores de *Penicillium roqueforti* en utilisant du pain d'orge bien cuit. Un deuxième objectif était d'utiliser les spores obtenues pour la fabrication d'un fromage type bleu.

Après avoir effectué une recherche bibliographique sur *Penicillium roqueforti* et les fromages bleus surtout le roquefort, Nous avons élaboré et suivi un protocole expérimental pour atteindre les deux objectifs assignés à ce travail. Malgré le peu de moyens (voire l'inexistence), nous avons pu produire des spores de *P. roqueforti* que nous avons utilisées pour l'élaboration d'un fromage type bleu.

Le fromage obtenu présente les caractéristiques organoleptiques générales d'un fromage à pâte persillée.

Durant notre travail expérimental, nous avons fait face à de nombreuses difficultés, la première difficulté est de trouver un lait de vache de qualité fromagère et riche en matières grasses sans lequel, il est difficile d'obtenir un bon caillé.,

La deuxième difficulté a été la non disponibilité d'un local et d'équipements adaptés à l'expérimentation fromagère ; Ainsi, il nous a été très difficile de maîtriser les températures, l'humidité, les moyens d'égouttage, de moulage, etc. Le fromage obtenu aurait été meilleure si les conditions étaient optimales notamment pour le développement du *Penicillium roqueforti*. Dans les conditions dans lesquelles nous avons travaillé, nous n'avons pas pu éviter les contaminations microbiennes du fromage obtenu.

Enfin, avec juste un minimum de moyens, pouvoir réussir de tels projets reste à notre portée.

Références bibliographiques :

ALMENA-ALISTE M, MIETTON B., 2014. Cheese classification, characterization and categorization: A global perspective. *Microbial Spectrum* 2: CM-0003-2012

ALONSO, L., JUAREZ, M., RAMOSE, M., MARTIN-ALVAREZ, P.J., 1987. Overall composition, nitrogen fractions and fat characteristics of Cabrales cheese during ripening. *Z. Für Lebensm.- Unters. Forsch.* 185, 481–486. doi:10.1007/BF01042813

Anonyme ANONYME (2015) . le livre LE LIVRE BLANC DU ROQUEFORT FROMAGE UNDERGROUND.fromage chef. pdf

ARDO, Y., 2011. Cheese: blue mold cheese, in: Fuquay, J.W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 767–772.

ARDO.Y , 2016. Blue Mold Cheese in Reference Module in Food Science, 2016

BOYSEN. M., SKOUBOE, P., FRISVAD, J., ROSSEN, L., 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species based on molecular genetics and biochemical profiles. *Microbiology* 142 (3), PP : 541-549

CAMARDO LEGGIERI, M., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., Battilani, P., 2017. Modeling growth and toxin production of toxigenic fungi signalled in cheese under different temperature and water activity regimes. *Toxins* 9, 4.

CANTOR M. D. , VAN DEN TEMPEL, TINE KRONBORG HANSEN T., ARDÖ Y., Blue Cheese in Paul McSweeney, Patrick Fox, Paul Cotter, David Everett ,ed *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* 2017 , PP 929

CANTOR, M.D., van den Tempel, T., Hansen, T.K., Ardö, Y., 2004. Blue cheese, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 175–198.

CHAVEZ, R., Fierro, F., Garcia-Rico, R.O., Laich, F., 2011. Moldfermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. In: Leitão, A.L. (Ed), Mycofactories. Bentham Science Publisher Ltd, pp. 73e98.

CHEESEMAN, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.-L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E., Bensimon, A., Giraud, T., Brygoo, Y., 2014. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat. Commun.* 5, 2876.

CHOISY C., Desmaeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J., et Tourneur C., (1997). Les phénomènes microbiens, Dans Le fromage (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.), 3ème ed., Tec et Doc. Lavoisier. pp 377

COGHILL, D., 1979. The ripening of blue vein cheese: a review. *Aust. J. Dairy Technol.* 34, 72– 75

COLLINS, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 373–389.

CONTON . E. J.-L.Jany M.Coton , *Penicillium roqueforti* in *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Third edition) , 2021 ,PP 599

COTON, M., Jany, J.-L., Coton, E., Giraud, T., 2014a. Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evol. Appl.* 7, 433e441.

DEVOYOD. J. J., G. BRET et J. E. AUCLAIR ; 1968 la' flore microbienne du fromage de roquefort in *Le Lait* / novembre-décembre 1968, PP 613

DUMAY R. 1970. *Le Roquefort*. Rodez/Paris: Perspectives Aveyronnaises /Montalba Éditions (1982)

EITENMILLER, R.R., Vakil, J.R., Shahani, K.M., 1970. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.* 35, 130–133. doi:10.1111/j.1365-2621.1970.tb12121.

ELLIS, D. (2007). Mycology online. University of Adelaide . School of molecular & biomedical science. The University of Adelaide

FAIRCLOUGH, A.C., Cliffe, D.E., Knapper, S., 2011. Factors affecting *Penicillium roquefortii* (*Penicillium glaucum*) in internally mould ripened cheeses: implications for pre-packed blue cheeses. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 1586e1590

FORGE M., GUIRAUD J. P., et GALZY P., (1977). - Etude d'un accident de fabrication du fromage de Roquefort. *Le Lait*, 1. LVII, 561-562, 24-36.

FRANK(H. K.) (1974). - Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe. Jahresbericht. 92 p.

GALLOIS, A., Langlois, D., 1990. New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Le Lait* 70, 89–106. doi:10.1051/lait:199028

GILLOT, G., Jany, J.-L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., Lopez-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T. Coton, E., 2015. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *PLoS One* 10, e0129849.

GILLOT, G., Jany, J.-L., Dominguez-Santos, R., Poirier, E., Debaets, S., Hidalgo, P.I., Ullan, R.V., Coton, E., Coton, M., 2017b. Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiol.* 62, 239e250.

GIUSEPPE L ,Margherita C, Sylvie Lortal , Artisanal Products Made With Raw Milk in Raw Milk Balance Between Hazards and Benefit ,2019 ,PP175

GOBBETTI, M., Burzigotti, R., Smacchi, E., Corsetti, A., De Angelis, M., 1997a. Microbiology and biochemistry of gorgonzola cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7, 519–529. doi:10.1016/S0958-6946(97)00047-2

GobbettiR. M ,BurzigottiE,SmacchiA,CorsettiM.De Angelis International Dairy Journal Volume 7, Issues 8–9, August–September 1997, Pages 519-529

GOLDING, N., 1945. The gas requirements of molds. IV. A preliminary interpretation of the growth rates of four common mold cultures on the basis of absorbed gases. *J. Dairy Sci.* 28, 737e750.

GONZALES De Llano, D., Ramos, M., Polo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I., 1990. Evolution of the volatile components of an artisanal blue cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 73, 1676–1683. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78842-X

GONZALES de Llano, D., Ramos, M., Rodriguez, A., Montilla, A., Juarez, M., 1992. Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 2, 121–135. doi:10.1016/0958-6946(92)90005-7

GOTTLIEB(D.) (1946). - The utilization of amino acids as a source of carbon by fungi. *Arch. Biochem.*, t. IX, 341-351.

GRAVESEN, S., Frisvad, J. C., and Samson, RA. (1994). *Microfungi*. 1st edition, -168 p. Copenhagen, Munksgaard.

GUEGUEN(M.). DEsFLEuRs (M.) et LEMARINIER(S.) (1978). - *Penicillium roquejorti* Thom responsable d'un nouvel accident en fromageries de pâtes molles. *Le Lait*, t. LVIII, 577, 327-335.

GUEVARA-SUAREZ, M., Garc_ia, D., Cano-Lira, J.F., Guarro, J., Gen_e, J., 2020. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium- like fungi in Aspergillaceae. *Fungal Systemat. Evol.* 5 (1), 39e68. <https://doi.org/10.3114/fuse.2020.05.03>

Guinee TP (2004) Salting and the role of salt in cheese. *Int J Dairy Technol* 57:99–109. doi: 10.1111/j.1471- 0307.2004.00145.x

HADLOK(R.), SAMSON(R. A.) und SCHNORR(B.) (1975). - Schimmelpilze und Fleisch: Gattung *Penicillium*. *Fleischwirtschaft*, t. LI, 979-984.

HARWIG(J.), BLANCHFIELD(B. J.) and SCOTT(P. M.) (1978). - Patulin production by *Penicillium roqueforti* from grape. *Canad. Inst. Food Sci. Technol. J.*, t. XI, 3, 149-151

HASHEM, K.M., He, F.J., Jenner, K.H., MacGregor, G.A., 2014. Crosssectional survey of salt content in cheese: a major contributor to salt intake in the UK. *BMJ Open* 4, e005051.

HOLLAND B, Unwin ID, Buss DH (1989). *Milk Products and Eggs. Fourth supplement to McCance and Widdowson's The Composition of Foods*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 146p.

HOUBRAKEN , J., Wang, L., Lee, H.B., Frisvad, J.C., 2016. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia* 36, 299.

HOUBRAKEN. J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2010. Sex in *Penicillium* series *roqueforti*. *IMA Fungus* 1, 171.

JANY J.L. et Barbier G., (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese: review. *Food Microbiol.*, 25, 839-848

JIRKOWSK'Y(M.) et GALGOCZY(J.) (1965). - A magyar teliszalami penészgomba-florájanak vizsgálatá. *Hussipar*, t. XIV, 106-108.

KALAI, S., Anzala, L., Bensoussan, M., Dantigny, P., 2017. Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. *Int. J. Food Microbiol.* 240, 124e130.

KINSELLA, J.E., Hwang, D.H., 1976. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8, 191–228.

Kongo et Malcata, 2016; Leclercq-Perlat, 2011)

LAMBERET, G., Menassa, A., 1983. Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium roqueforti*. *J. Dairy Res.* 50, 459–468. doi:10.1017/S0022029900032696

LAMBERT, G., Menassa, A., 1983. Détermination et niveau des activités lipolytiques dans les fromages à pâte persillée. *Le Lait* 63, 333–344. doi:10.1051/lait:1983629-63020

Le Bars D, Gripon J. (1981) Role of *Penicillium roqueforti* proteinases during blue cheese ripening. *J Dairy Res* 48:479–487.

LEISTNER(L.) und AYRES(J. C.) (1967). - Schimmelpilze und Fleischwaren. *Fleischwirtschaft*, 1. XLVII, 1320-1326

LOPEZ-Díaz, T., Santos, J., Otero, A., Garcia, M., Moreno, B., 1996. Some technological properties of *Penicillium roqueforti* strains isolated from a home-made blue cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 5e8.

MADADLOU.A, Mousavi M, Khosrowshahiasl A, et al. (2007) Effect of cream homogenization on textural characteristics of low-fat Iranian White cheese. *Int Dairy J* 17:547–554. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.07.006

MARCOS, A., Esteban, M.A., León, F., Fernández-Salguero, J., 1979. Electrophoretic patterns of european cheeses: comparison and quantitation. *J. Dairy Sci.* 62, 892–900. doi:10.3168/jds.S0022-0302(79)83345-7

MARTÍN J.F, M. Coton, *Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites in Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, 2017 PP 275 -276

MASE, T., Matsumiya, Y., Matsuura, A., 1995. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 329–330. doi:10.1271/bbb.59.329

MCSWEENEY P (2004) Biochemistry of cheese ripening. *Int J Dairy Technol* 57:127–144.

Mcsweeney PLH, Fox PF, O'Connor TP, et al. (1996) *Cheese: Physical, Biochemical, and Nutritional Aspects*. *Adv Food Nutr Res* 39:163–328.

MCSWEENEY, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 347–360.

MCSWEENEY, P.L.H., Ottogalli, G., Fox, P.F., 2004. Diversity of cheese varieties: an overview, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 1–22.

MCSWEENEY, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Le Lait* 80, 293–324. doi:10.1051/lait:2000127

MENASSA, A., Lamberet, G., 1982. Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. *Le Lait* 62, 32–43. doi:10.1051/lait:1982611-6122

MEYERS(E.) and KNIGHT (S. G.) (1961). - Studies on the intracellular amino acids of *Penicillium roqueforti*. *Mycologia*, t. LIII, 115-122

MEYERS(E.) and KNIGHT(S. G.) (1958). - Studies on the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.*, t. VI, 3, 174-178

MIETTON.B, CHABLAIN. I , Pratique et techniques fromageres des différentes familles de fromages in GILLIS J-C et AYERBE ,A coord LE FROMAGE 4 em edition 2019 , PP 34

MOIO, L., Piombino, P., Addeo, F., 2000. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J. Dairy Res.* 67, 273–285. doi:10.1017/S0022029900004106

MOREAU(M.) (1978). - La mycoflore des bouchons de liège. Son évolution au contact du vin ; conséquences possibles du métabolisme des moisissures. *Rev. de Mycol.*, 1. XLII, 155-189

MOREAU, C., 1980. *Le Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, inter^et en industrie fromagere, mycotoxines (Revision bibliographique). *Lait* 60, 254e271.

NAIR M (2000) Yield and functionality of Cheddar cheese as influenced by homogenization of cream. *Int Dairy J* 10:647–657. doi: 10.1016/S0958-6946(00)00090-X

NGUYEN Van Long, N., 2017d. Impact de Facteurs Abiotiques sur la Physiologie des Moisissures d'Inter^et Agro-alimentaire (PhD thesis). Universite de Bretagne Occidentale, Brest.

NGUYEN Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017b. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiol.* 68, 7e15.

NGUYEN Van Long, N., Vasseur, V., Coroller, L., Dantigny, P., Le Panse, S., Weill, A., Mounier, J., Rigalma, K., 2017c. Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 151e160.

O'BRIEN, M., Egan, D., O'kiely, P., Forristal, P.D., Doohan, F.M., Fuller, H.T., 2008. Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycol. Res.* 112, 921–932. doi:10.1016/j.mycres.2008.01.023

ORTH (R.) (1976). - PR - Toxinbildung bei *Penicillium roqueforti* - Stårnmen. *Z. Lebensm. Untersuch.-Forsch.*, 1. CLX, 2, 131-136

PASTORINO A., Hansen C., McMahon DJ (2003) Effect of salt on structure-function relationships of cheese. *J Dairy Sci.* 86:

PATTERSON, T. F., McGinnis, M. R., and ed. (2009). The fungi :description. Site Doctor Fungus . Mycoses Study Group

PAULSON BM, McMahon DJ, Oberg CJ (1998) Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. *J Dairy Sci* 81:2053–2064. doi: 10.3168/jds.S0022- 0302(98)75780-7

PELHATE(J.) (1975). - Mycoflore des maïs-fourrages ensilés. Déterminisme de son évolution. Rev. de Mycol., 1. XXXIX, 65-95.

PITT, J.I., Hocking, A.D., 2009. Fungi and Food Spoilage, 3rd ed. Springer, London.

QUATTRINI, M., Liang, N., Fortina, M.G., Xiang, S., Curtis, J.M., Ganzle, M., 2019. Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. Int. J. Food Microbiol. 302, 8e14.

RACOVITA(A.) und CONSTANTINESCU(T.) (1969). - Die Bedeutung von Schimmelpilzüberzügen auf Dauerwürsten. Fleischwirtschaft, t. XLIX, 461-466.

RAMET J.P., (1987). La préparation du caillée, 1- : La présure et les enzymes coagulantes. Dans Le fromage (Coord. ECK A.), Tec et Doc. Lavoisier, pp 101- 107, 539 p

RAMET J.P., (1997). L'égouttage du coagulum. Dans Le fromage (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.). 3ème édition, Ed. Tec et Doc. Lavoisier. p. 43.

RATTRAY, F.P., Eppert, I., 2011. Cheese: secondary cultures, in: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edition. Academic Press, San Diego, pp. 567–573.

RENNEBERG.R , Viola Berkling ,Vanya Loroç ;Beer, Bread, and Cheese: The Tasty Side of Biotechnology in Biotechnology for Beginners 2nd Edition - November 25, 2017

SAINT-EVE A, Lauverjat C, Magnan C, et al. (2009) Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. Food Chem 116:167– 175.

SAMSON, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B., 2010. Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

SAMSON, RA, Hoekstra, ES, and et al. (1984). Introduction to food and airborne fungi. 6th, -389 p. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.

SAMSON, RA, Hoekstra, ES, and Frisvad, JC. (2004). Introduction to food and airborne fungi. 7th, -389 p. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.

SAMSON.R.A., Frisvad, J.C., others, 2004. Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Stud. Mycol. 49, 1e266.

SOUSA M (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. Int Dairy J 11:327–345. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00062-0

SPINNLER, H.E., 2009. Production d'arômes par voie biotechnologique. Tech. L'Ingénieur.

TANIWAKI, M., Hocking, A., Pitt, J., Fleet, G., 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. Int. J. Food Microbiol. 68, 125e133.

TANIWAKI, M., Hocking, A., Pitt, J., Fleet, G., 2010. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. Int. J. Food Microbiol. 143, 218e225.

TANIWAKI, M.H., 1997. Growth and Mycotoxin Production by Fungi under Modified Atmospheres (PhD thesis). University of New South Wales, Sidney; Australia .

TAYLOR, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. 31, 21e32. Torrent, C.,

THOM (C.) and CURRIE (J. N. (1913). - The dominance of Roquefort mold in cheese. Journ. Biol. Chem., t. XV, 249-258.

TRIEU-CUOT, P., Gripon, J.C., 1983. Etude électrophorétique de la protéolyse au cours de l'affinage des fromages à pâte persillée du type bleu d'Auvergne. Le Lait 63, 116–128. doi:10.1051/lait:1983625-62610

TSUBAKI(K.) (1976). - *Penicillium* isolated from toxie ensilage. Trans. Mycol. Soc. Jap., t. 1, 6-7.

TSUNODA (H.) (1970). - Microorganisms which deteriorate stored cereals and grains. In Herzberg (M.). Toxic microorganisms, 143-162.

UDAGAWA(S. 1.), ICHINOE(M.) and Ku RATA(H.) (1970). - Occurrence and distribution of mycotoxin producers in Japanese foods. In Herzberg (M.). Toxic microorganisms, 174-184.

VALIK, L., Baranyi, J., Georger, F., 1999. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. Int. J. Food Microbiol. 47, 141-146.

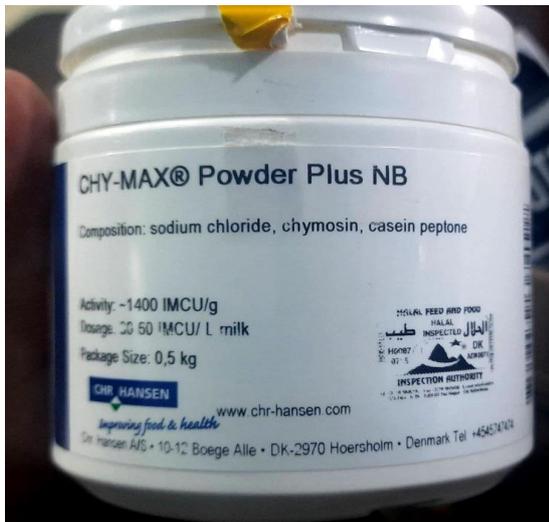
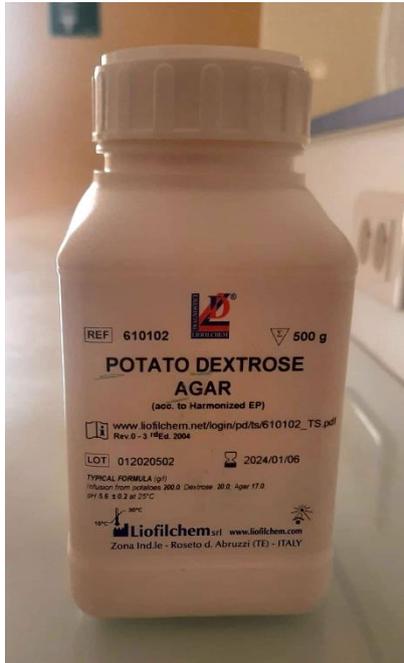
WEBER F, (1987). L'égouttage du coagulum. Dans le fromage (coord. ECK A), 2ème édition. p122.

WOO, A.H., Kollodge, S., Lindsay, R.C., 1984. Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. J. Dairy Sci. 67, 874-878. doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81380-6

Webographie

- [1] (<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000768632>)
- [2] (<https://www.roquefort-papillon.com/>,
- [3] (www.roquefort.fr)
- [4] (<http://biologie.ens-lyon.fr>)
- [5] (<https://www.fromagesetchefs.fr/>)
- [6] (<https://www.laboitedufromager.com/>)
- [7] (<https://www.leguidedufromage.com/roquefort-io319.html>)

Annexes :



Test hédonique :

nom et prénom :

sex :

age :

un test hédonique est un test consommateur visant à mesurer le plaisir et /ou la satisfaction éprouvés à la vue ou à la consommation / usage d'un produit .

	1	2	3	4	5
Odeur					
Acidité					
Gout					
Texture					

1 point : très peu

2 points : peu

3 points : moyen

4 points : fort

5 points : très fort