

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DES BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de master en sciences biologiques.
Spécialité : Alimentation Humaine et Qualité des Produits.

Réalisé par :

M^{elle} : MEFTAH Sara.

M^{elle} : SI AHMED Lydia.



Devant le jury composé de :

Présidente: M^{me} SENANI NASSIMA Ep. OULARBI M.A.C.A.

Promoteur: M^r. SEBBANE HILLAL M.A.C.A.

Examinatrice : M^{lle} ASMANI KATIA LOUIZA M.A.C.A.

Examinatrice: M^{me} SENOUSSE CHAHRA Ep. GHEZALI M.A.C.A.

2015-2016



Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord le DIEU le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a donnés pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier également Mr SEBBANE notre promoteur qui a accepté de nous encadrer sans la moindre hésitation et qui nous a guidé et suivi tout au long de notre travail. Nous ne saurons jamais leur exprimer toute notre profonde gratitude pour leur contribution et leur soutien.

Nous remercions vivement, M^{me} SENANI ép. OULARBI de nous avoir fait l'honneur de présider le jury, ainsi que M^{me} SENOUSSE ép. GHEZALI et M^{elle} ASMANI d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos vifs remerciements vont vers la famille AIT ABDELMALLEK pour leurs aides, leurs soutien et le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à nous tenons compagnie au cours de notre travaille.

On exprime nos profonds remerciements à M^{elle} KERROUR responsable de laboratoire de l'unité STLD ainsi que tout les travailleurs de cette unité.

Nous tenons à exprimer nos sincères gratitudes aux enseignants qui ont veillé à nous transmettre fidèlement leur savoir.

Ces quelques lignes ne pourront jamais exprimer la reconnaissance que nous éprouvons envers tous ceux ou celles qui, de près ou de loin, ont contribué, par leurs conseils, leurs encouragements ou leurs amitiés à l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

*je dédie ce modeste travail:
à dieu le tout puissant.*

*A mes chers parents pour leurs soutien, leur aide, leur
patience et surtout pour leurs amour, qui m'ont toujours
encouragé et souhaité la réussite; que DIEU vous
protège et vous prête une longue et heureuse vie.*

*A mon très cher frère, Soufiane pour son soutien, son
sacrifice, et ses conseils que le bon dieu le bénisse.*

*A mes très chers frères Hakim, Samir ,Merz ouk et
Yacine.*

*Ames très chers sœurs Ouiza et Hayet, Sabrina ainsi
que leurs maries Mokrane et Abdenour et leurs
enfants,Hakim, Massi, Amayas, Tinhinane, Samy et
Amine.*

*A mes belles sœurs Nadia et Nabila. et leurs enfants ,
Fares,Maya,Ikram,Rania,Elina et Mohamed amine.*

Ainsi que ma belle sœur Karima.

*A Sara avec qui j'ai partagé ce travail avec tout les bon
moments et toute sa famille.*

*Mes dédicaces ne seront pas complètes sans cité mes
amies:Dyhia, Sara,Noura,Karima,
Sonia,Sabrina,Lynda,Hadia,Lila,Malika,Lydia,Yasmine
et toutes les akhawates de Bastos, Tamda,M'douha et
ILE.*

A toute la promotion A.H.Q.P.2015-2016.

A tous ceux qui me sont chers.

Lydia

Dédicaces

*je dédie ce modeste travail:
à dieu le tout puissant*

*A mes chers parents pour leurs soutien, leurs aide, leurs
patience et surtout pour leurs amour, qui m'ont toujours
encouragé et souhaité la réussite; que DIEU vous protège et
vous prête une longue et heureuse vie.*

A ma très chère sœur, Nilda.

A mes très chers frères Michael et Aissa.

*A Lydia avec qui j'ai partagé ce travail avec tout les bon
moments et toute sa famille.*

A ma grand-mère Aldjia que Dieu la protège.

*A ma grand mère Taous que dieu l'acueil dans son vaste
paradis.*

Amon grand père Mhena.

A ma tante Nora et son fils adoré Alilou.

*A mon oncle Abd nacer, et ma tante Farida, leurs filles Taous,
Lynda, Sonia et manissa.*

*Amon oncles Smail , sa femme Mariama et leurs deux
sublimes enfants Mhena et yani.*

A mon fiancé Massinissa.

A ma belle mère Zahia.

*A ma belle sœur Kahina, son mari Meziane et ces trois
adorables filles : Celvia, Thiziri et Maya.*

A ma belle sœur Nora et sa famille.

*Mes dédicaces ne seront pas complètes sans cité mes amies:
Lydia, Lydia ,Rebiha, Leila, Thanina et Miassa et Louiza.*

A toute la promotion A.H.Q.P.2015-2016.

A tous ceux qui me sont chers.

Sara

SOMMAIRE

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Généralité sur le lait

I.1.1. Définition du lait.....	1
I.1.2.Les propriétés physico-chimiques du lait.....	1
I.1.3.Composition physicochimique et microbiologique.....	2
I.1.3.1.Composition physicochimique.....	2
I.1.3.2.Microbiologie du lait.....	7
I.1.4.Facteurs de variations de la composition du lait.....	7
I.1.4.1.Facteurs intrinsèques.....	7
I.1.4.2.Facteurs extrinsèques.....	8

I.2.Camembert

I.2.1.Définition du fromage.....	9
I.2.2.Définition du camembert.....	9
I.2.3.Classification (frais et affiné).....	9
I.2.4.Composition physicochimique du fromage.....	10
I.2.5.Fabrication fermière.....	12
I.2.5.1.Fromage fermier.....	12
I.2.5.2.Les fromages au lait cru.....	12
I.2.6.Technologie de fabrication du camembert.....	12
I.2.6.1.La coagulation du lait.....	13
I.2.6.2.L'égouttage du gel.....	13
I.2.6.3.L'affinage du caillé.....	13

I.3.Etude de la phase d'affinage

I.3.1.Généralité sur l'affinage.....	14
I.3.2.Facteurs d'affinage.....	14
I.3.3.Agents d'affinage des fromages.....	15
I.3.3.1.Enzymes du lait.....	15
I.3.3.2.Enzymes coagulantes.....	15
I.3.3.3.Enzymes d'origine microbienne.....	15
I.3.3.4.Bactéries lactiques.....	15
I.3.3.5.Levures.....	16
I.3.3.6.Moisissures.....	16

I.3.4. Les modifications biochimiques au cours de l'affinage.....	16
I.3.4.1. Fermentation du lactose.....	17
I.3.4.2. Lipolyse	18
I.3.4.3. Protéolyse	18
I.3.4.3.1. Peptides bioactifs.....	19
I.3.5. Microbiologie de l'affinage	20
I.3.5.1. Flores bactériennes	20
I.3.5.1.1. Bactéries lactiques.....	20
I.3.5.1.2. Bactéries de surface.....	21
I.3.5.2. Flores fongiques.....	22
I.3.5.2.1. Levures.....	22
I.3.5.2.2. Moisissures.....	22
I.3.6. Les défauts d'affinage.....	23
I.3.6.1. défauts de saveur et d'arôme.....	23
I.3.6.2. Défauts de texture et de gonflement.....	23
I.3.6.3. Défauts d'aspect et de croutage.....	24

PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. Présentation de l'unité STLD.....	25
II.2. Présentation de la fromagerie artisanale « saint amour ».....	26
II.3. Matériel et méthodes	27
II.3.1. Echantillonnage.....	27
II.3.2. processus de fabrication du camembert au niveau de la laiterie STLD de Tizi Ouzou.....	27
II.3.3. processus de fabrication du camembert au niveau de la fromagerie artisanale « saint amour ».....	28
II.3.4. Suivi de la microflore.....	30
II.3.4.1. Préparation de la suspension mère et dilutions décimales.....	32
II.3.4.1.1. préparation de la suspension mère	32
II.3.4.1.2. Préparation des dilutions décimales	32
II.3.4.2. Dénombrement des principales flores	34
II.3.4.2.1. Les germes aérobies totaux (GAT) dans le lait et le camembert.....	34
II.3.4.2.2. Dénombrement des levures et moisissures (lait et fromages).....	36
II.3.4.2.3. Dénombrement des streptococcus lactiques (lait et fromages).....	39
II.3.4.2.4. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	41
II.3.4.3. Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	43
II.3.5. Analyse physicochimique.....	46
II.3.5.1. Le pH	46
II.3.5.2. Détermination de la densité.....	46
II.3.5.3. L'acidité de titration ou acidité Dornic.....	46
II.3.5.4. Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode de GERBER (1974).....	47
II.3.5.5. Détermination de l'extrait sec total (EST).....	47
II.3.5.6. Test d'antibiotique	47
II.3.5.7. Dosage des protéines par la méthode de Bradford et al, (1976).....	47
II.3.6. Etude de l'activité antimicrobienne.....	48
II.3.6.1. principe.....	48
II.3.6.2. Technique	48
II.3.6.2.1. Détermination de l'activité antibactérienne en milieu gélosé.....	49
II.3.6.2.2. Détermination de l'activité antibactérienne en milieu liquide.....	49
II.3.7. Activité anti-oxydante.....	50

II.3.7.1. Activité anti-radicalaire.....	50
II.3.7.2. Pouvoir chélateur.....	50
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	
III.1. Résultats physicochimiques du lait.....	52
III.2. Moyenne des résultats d'analyses physico-chimiques du camembert artisanal « Saint Amour » et industriel « Fermier » au cours d'affinage.....	54
III.3. Evolution de la microflore au cours de l'affinage	55
III.3.1. Résultats microbiologique du lait.....	55
III.3.2. Moyennes des résultats d'analyses microbiologiques des différents types de fromage	59
III.3.3. Interprétation des résultats	59
III.4. Résultats des activités biologiques dans le fromage.....	67
III.4.1. Détermination de l'activité antibactérienne en milieu gélosé.....	67
III.4.2. Détermination de l'activité antibactérienne en milieu liquide.....	70
III.4.3. Résultats des activités anti oxydantes et anti radicalaires.....	72

CONCLUSION

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

MRS: Man, Rogosa et Sharpe

MH: Muller-Hinton

PCA: Plate Count Agar

GC: Giolitti et Contoni

VRBL : Gélose Lactosée Biliée au cristal Violet et au rouge neutre

BHIB : Bouillon Heart Infusion Brain

OGA : Agar Glucosée à l'Oxytétracycline

L&M : Levures et Moisissures

CT : Coliformes Totaux

CF : Coliformes Fécaux

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale

SM : Suspension Mère

JOA : Journal Officiel Algérien

UFC : Unité Formant Colonie

BSA : Sérum Bovine Albumine

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

EST : Extrait Sec Totale

ESD : Extrait Sec Dégraissé

MG : Matière Grasse

Liste des figures

Figure 1: Composition de la matière grasse du lait	3
Figure 2: Modèle d'organisation moléculaire de la micelle de caséine.....	4
Figure 3 : Classification des fromages	10
Figure4 : Etapes de fabrication du fromage.....	12
Figure 5 : principaux mécanismes biochimiques de l'affinage	16
Figure 6: protéolyse des caséines et catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromage.....	19
Figure 7 : Diagramme de fabrication du camembert fermier et industriel.....	29
Figure 8 : recherche et dénombrement des FTAM sur milieu PCA dans le lait.....	34
Figure 9 : dénombrement de la flore mésophile totale dans le fromage.....	35
Figure 10 : recherche et dénombrement des levures et moisissures sur milieu OGA dans le lait.....	36
Figure 11 : dénombrement des levures et moisissures sur milieu OGA dans le fromage.....	37
Figure 12 : recherche et dénombrement des lactobacilles dans le lait.....	38
Figure 13 : dénombrement des lactobacilles dans le fromage sur milieu MRS.....	39
Figure 14 : recherche et dénombrement des streptococcus dans le lait.....	40
Figure 15 : dénombrement des streptocoques dans le fromage sur milieu MRS.....	41
Figure 16 : recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans le lait.....	42
Figure 17 : dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans le fromage sur milieu VRBL.....	43
Figure 18 : recherche de <i>staphylococcus aureus</i>	45
Figure 19: Test coagulase.....	46
Figure 20: Test catalase.....	46
Figure 21 : évolution du ph et l'acidité du fromage artisanal » Saint amour » aux différents stades d'affinage.....	55

Figure 22 : évolution du ph et l'acidité du fromage industriel » Fermier » aux différents stades d'affinage.....	55
Figure 23 : Evolution de la flore microbienne au cours de l'affinage.....	59
Figure 24 : Evolution de la flore microbienne au cours de l'affinage.....	63
Figure 25 : les zones d'inhibitions obtenues vis-à-vis <i>E.coli</i> dans les deux types du camembert.....	67
Figure 26 : les zones d'inhibitions obtenues vis-à-vis <i>S.aureus</i> dans les deux types du camembert.....	67
Figure 27 : les zones d'inhibitions obtenues vis-à-vis <i>S.aureus</i> et <i>e.coli</i> dans les deux types du fromages.....	68
Figure 28 : Evolution du pouvoir chélateur et anti-radicalaire des fromages au cours de l'affinage.....	72
Figure 29 : Evolution du pouvoir chélateur des fromages au cours de l'affinage.....	73

Listes des tableaux

Tableau I : Les propriétés physico-chimiques du lait	1
Tableau II : composition moyenne du lait.....	2
Tableau III: La composition du lait en minéraux.....	5
Tableau IV: Composition vitaminique moyenne du lait cru	6
Tableau V: flore indigène du lait	7
Tableau VI: composition moyenne de fromage à pate molle et à croute fleurié de type camembert.....	10
Tableau VII: principaux effets de la glycolyse sur la qualité des fromage.....	17
Tableau VIII : classification des flores microbiennes dénombrés et recherché dans les deux types des fromages.....	30
Tableau XI: Valeur moyenne des analyses physicochimiques du lait utilisé en fabrication fromagère.....	52
Tableau X : moyennes des résultats physicochimiques.....	54
Tableau XI : résultats de l'analyse microbiologique du lait.....	56
Tableau XII : recherche des bactéries pathogènes dans le fromage « Fermier ».....	61
Tableau XIII: résultats de la recherche des bactéries pathogènes dans le camembert « Saint amour ».....	66
Tableau XIV : suivi de la densité optique avant et après 24 h des cultures microbiennes...	70
Tableau XV : croissance de <i>staphylococcus aureus</i> et <i>E.coli</i> avant et après 24 h.....	71
Tableau XVI: résultats de l'activité anti-oxydante dans le lait.....	72

Introduction



L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers qui occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale. L'Algérie est le premier consommateur du lait au Maghreb, avec près de 5,5 milliards de litres par an. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, la filière Lait connaît une croissance annuelle de 10%. Avec un taux de collecte inférieur à 15%, cette filière reste, cependant, fortement dépendante de l'importation de poudre de lait.

Le lait est un aliment aux nombreuses vertus, riche en calcium, en vitamines et en protéines. C'est le compagnon indispensable d'une alimentation équilibrée. Lait, yaourts, fromages... Les produits dérivés du lait ont des qualités souvent similaires et conviendront à tous les goûts à manger ou à boire à chaque repas.

En Algérie, le lait cru est transformé par des méthodes traditionnelles en fromage, et autres produits laitiers. Ces produits retiennent leurs qualités désirables même après une longue conservation à température ambiante.

Les fromages sont des formes de conservation et de stockage ancestrales de la matière utile du lait dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont très appréciées, en Algérie la production locale consiste essentiellement en fromage fondu (80-90 000 t/an), en fromage à pâte molle de type Camembert-Brie (7-8 000 t/an) et en fromages type petits suisses natures ou aromatisés (6-7 000 t/an).

En Algérie, Les fromages traditionnelles sont peu nombreux non entièrement recensés et peu étudié, environ dix types des fromages sont connu dans les différents régions du pays, Malheureusement plusieurs d'entre ces fromages sont en voie de disparition, pour ces différentes raisons dont l'indispensabilité fromagère, l'exode rural et le changement des habitudes alimentaires, nous ignorons le devenir de ces produits mais il convient de faire tous ce qui est possible pour le connaître, maintenir leurs existences et encourager leur fabrication, Car ces fromages artisanaux contiennent toutes les richesses, les caractéristiques et les goûts des pâturages dont il est le fruit, il les transformera fidèlement au fromage qui résultera. Ces fromages présentent un bien culturel avant d'être une ressource économique qui doit être bien caractérisée et protégé.

A l'échelle industrielle par contre il est plus répandu d'utiliser le lait cru pasteuriser en fabrication fromagère car l'industrie a besoin d'une très grande quantité de lait pour satisfaire sa production. Ainsi afin d'éviter tout risques ce lait doit subir une pasteurisation, le chauffer suffisamment pour réduire l'ensemble de la flore microbienne active, mais en même temps ce traitement thermiques détruit toute la flore spécifique, celles qui apportent justement aux fromages leurs goûts et arômes.

Cette étude à été menée dans le but de comparer entre deux types de fromages à pate molle types camembert l'un issu d'une fabrication industrielle « Fermier » fabriqué au sein de la laiterie STLD de Tizi Ouzou à base du lait pasteurisé, l'autre d'une fabrication fermière artisanale « saint amour » fabriqué au sein de la fromagerie artisanale de Ouacif sur le plan physico-chimique et microbiologique ainsi que la détection des acticité biologique, antimicrobienne et antioxydante.

Dans un premier temps l'étude s'est consacré à la caractérisation microbiologique des deux types camemberts de la matière première jusqu'au produit fini et tout au long de l'affinage. Cette caractérisation consiste au dénombrement des principaux groupes microbiens sur milieux sélectifs, et la recherche de quelques germes pathogènes afin de s'assurer de la qualité du produit fini.

Dans un second temps en s'est consacré au suivi de l'évolution des paramètres physicochimiques tout au long de la fabrication a partir du lait jusqu'au fromage ainsi que tout au long de l'affinage des deux fabrications industrielle et fermière.

Au final, l'étude consiste à mettre en évidence le pouvoir auto préservatif des camemberts contre les bactéries pathogènes par l'étude de l'activité antibactérienne et aussi l'étude du pouvoir chélateur et réducteur par l'estimation du l'activité anti oxydante au cours de l'affinage des deux camemberts.

Généralité



I.1 Généralité sur le lait

I.1.1. Définition du lait

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant :

« Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (ALAIS, 1975).

I.1.2. Les propriétés physico-chimiques du lait

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique ou la densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité, cette dernière est mesurée en degré dornic (D°), 1D° correspond à 1mg d'acide lactique dans 10ml du lait. Comme le montre le tableau suivant :

Tableau I : Les propriétés physico-chimiques du lait (VIGNOLA, 2002)

Les propriétés physico-chimiques	valeurs
pH	6.6-6.8
Acidité	15 à 17 °D
Le point d'ébullition	100,5°C
Le point de congélation	-0,575°C à -0,530°C

❖ pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+), et une diminution du pH (CIPC lait, 2011).

❖ Acidité

Selon JEAN et DIJON (1993), l'acidité du lait résulte de l'acidité naturelle, due à la caséine, aux groupes phosphate, au dioxyde de carbone et aux acides organiques et de l'acidité développée, due à l'acide lactique formé dans la fermentation lactique.

❖ Point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, se situe entre -0,54 °C et -0,55°C (MATHIEU, 1998).

La mesure de ce paramètre permet l'appréciation de la quantité d'eau éventuellement ajoutée au lait. Un mouillage de 1% entraîne une augmentation du point de congélation d'environ 0,0055°C (GOURSAUD, 1985).

❖ **Point d'ébullition**

D'après AMIOT et *al.* (2002), on définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100.5°C.

I.1.3.Composition physicochimique et microbiologique**I.1.3.1.Composition physicochimique**

Le lait est un milieu multiphasique : constitué d'une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose et les sels minéraux et d'une phase dispersante de nature lipidique (globules gras) et de nature protéique (micelles de caséines) (MAHAUT et *al.*, 2003).

Sa composition présentée dans le tableau II, varie en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite (ROUDAUT et LEFRANCQ, 2005).

Tableau II : composition moyenne du lait (ALAIS et *al.*, 2008).

Constituants	Composition (g/l)	Etats physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvante) +eau liée
Glucides : lactose	49	(3.7%) solution
Lipides	35	Emulsion des globules gras (3 à 5microns de diamètre.)
Matiere grasse propement dite	34	
Lécithine (phospholipides)	0.5	
Partie insaponifiable (stérol, carotènes, tocophérols)	0.5	
Protéines	34	Suspension micellaires de phosphocaseinates de calcium
Caséines	27	
protéines soluble	5.5	
substances azotés non protéiniques	1.5	Solution colloïdale
Sels :	9	Solution vrai
Acide citrique	2	
acide phosphorique	2.6	
acide chlorhydrique	1.7	

❖ L'eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important de 900 à 910 g par litre. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire est ce qui lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum (JEAN AMIOT et *al*, 2002), (MATHIEU, 1998).

❖ Matière grasse

JEANTET et *al*. (2008), rapportent que la matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0.1 à 10µm qui est essentiellement constitué de triglycérides (98%). La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait. Elle est constituée de 65% d'acides gras saturés et de 35% d'acides gras insaturés. Qui renferme :

- une très grande variété d'acides gras (150différents) ;
- une proportion élevée d'acides gras à chaînes courtes, assimilés plus rapidement que les acides gras à longues chaînes ;
- une teneur élevée en acide oléique ($C_{18:1}$) et palmitique ($C_{16:0}$) ;
- une teneur moyenne en acide stéarique ($C_{18:0}$).

La figure 1 présente un globule gras du lait. La membrane est constituée de phospholipides, de lipoprotéines, de cérebrosides, de protéines, d'acides nucléiques, d'enzymes et d'oligoéléments (métaux) et d'eau (BYLUND, 1995).

Figure 1: Composition de la matière grasse du lait (BYLUND, 1995)

❖ Matières azotées

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers.

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (GOURSAUD, 1985).

Les protéines du lait se répartissent en deux phases : une phase micellaire qui représente les caséines totale (environ 80% des protéines du lait) du lait et une phase soluble protéique (environ 17%) du lait est présente dans le lactosérum. Les deux principales protéines sériques sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine (VIGNOLA, 2002).

• Caséines

Les micelles de caséines sont constituées de 92% de protéines et de 8% de minéraux, leur point isoélectrique moyen est de 4,6. Elle est formée par quatre protéines individuelles:

- Alpha-caséines ou caséines α_{s1} 36 % et α_{s2} 10 %
- Bêta-caséine ou caséine β 34 %
- Kappa-caséine ou caséine κ 13 %
- Gamma-caséines ou caséine γ 7 % (produits de la protéolyse de la β -caséine par la plasmine du lait) (GOY et al, 2005).

Jusqu'à maintenant, il existe différents modèles structuraux de micelles et qui affirment clairement que les micelles sont formées de sous-micelles reliées ensemble par des ponts phosphate de calcium. Les sous-micelles périphériques sont plus hydrophiles et contiennent une plus grande proportion de κ -caséine. La figure 2 schématise clairement la structure micellaire et sous micellaire.

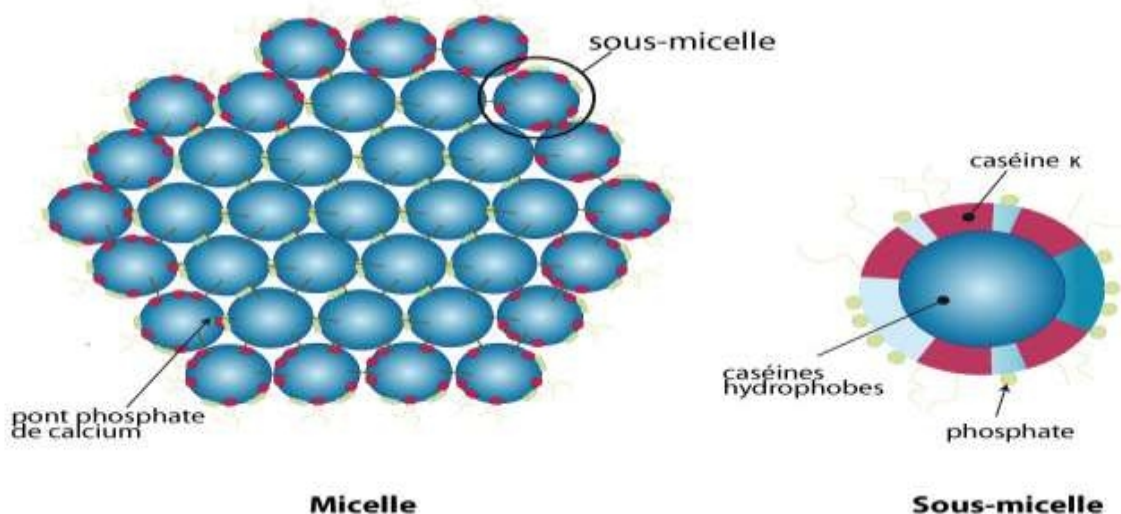


Figure 2:Modèle d'organisation moléculaire de la micelle de caséine selon SCHMIDT (1980)

Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation. Elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromage et en laits fermentés (RAMET, 1985).

- **Protéines de sérum**

Les protéines du sérum, qui représentent environ 20% des protéines totales, se retrouvent sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine ; les autres protéines du sérum sont les immunoglobulines, le sérum albumine bovine (SAB) et la lactoferrine. En plus, différents enzymes sont présents dans le sérum (VIGNOLA, 2002), (CAYOT et LORIENT, 1998).

- ❖ **Lactose**

Le lactose est un sucre réducteur synthétisé exclusivement par la mamelle, formé d'un glucose et d'un galactose. Dans le lait, il est utilisé comme source d'énergie par les microorganismes et est alors dégradé en acide lactique. L'indice de dégradation du lactose est mesuré par l'acidité titrable du lait en degré Dornic. Cette transformation graduelle du lactose en acide lactique fait abaisser le pH du lait et favorise la coagulation (AMIOT et *al*, 2002)

- ❖ **Minéraux**

La fraction minérale du lait est surtout composée de calcium, potassium, magnésium et sodium qui existent sous forme de sels solubles avec des éléments acides : protéines, acides citriques, phosphates et chlorures (voir tableau III).

Le lait apporte aussi des oligoéléments à l'état de traces : zinc, iode, cuivre. Il est en revanche carencé en fer et contient peu de sodium (MAHAUT et *al*, 2000).

Tableau III: La composition du lait en minéraux (VIGNOLA, 2002).

Minéraux	Teneurs (mg/kg)
Sodium (Na)	445
Magnésium (Mg)	105
Phosphate (P)	896
Chlore (Cl)	958
Potassium (K)	1 500
Calcium (Ca)	1 180
Fer (Fe)	0.50
Cuivre (Cu)	0.10
Zinc (Zn)	3.80
Iode (I)	0.28

A cette liste s'ajoutent certains éléments, comme le soufre présent dans les protéines et les oligo-éléments, qui sont présents à de faibles concentrations ou à l'état de trace : manganèse, bore, fluor, silicium, brome, etc...

Cette composition est sujette à l'importante variation selon les saisons et l'alimentation des vaches.

❖ Les vitamines

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique.

Les vitamines sont classées en deux grandes catégories :

- Les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait.
- les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie (DEBRY, 2001).

Le tableau suivant représente la composition vitaminique moyenne du lait cru.

Tableau IV: Composition vitaminique moyenne du lait cru (AMIOT et *al*, 2002).

Vitamines	Teneur moyenne
<i>Vitamines liposolubles</i>	
Vitamine A (+carotènes)	40µg/100ml
Vitamine D	2.4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	5µg/100ml
<i>Vitamines hydrosolubles</i>	
Vitamine C (acide ascorbique)	2mg/100ml
Vitamine B ₁ (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B ₂ (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B ₆ (pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B ₁₂ cyanocobalamine)	0.45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5.5µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3.5µg/100ml

I.1.3.2. Microbiologie du lait

Les microorganismes du lait, sont répartis selon leur importance, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore de contamination qui est subdivisée en deux sous-classes : la flore d'altération et la flore pathogène (VIGNOLA, 2002).

❖ Flore indigènes ou originale

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans les conditions aseptiques, il devrait contenir moins de 5000 UFC/ml. La flore indigène des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation et la race. Les germes dominants sont principalement des microorganismes mésophiles (voir tableau V).

Tableau V: flore indigène du lait (FIL, 2002).

Microorganismes	Pourcentage(%)
<i>Micrococcus sp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou lactococcus</i>	<10
<i>Gram négatif</i>	<10

❖ Flore de contamination

Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels du goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (VIGNOLA, 2002). Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, corynébactéries, *Bacillus*, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière.

Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (LEYRAL et VIERLING, 2007).

I.1.4. Facteurs de variations de la composition du lait

Selon COULON (1994) cité par POUGHEON (2001), la composition chimique du lait et ses caractéristiques technologiques varient sous l'effet d'un grand nombre de facteurs. Ces principaux facteurs de variation sont bien connus, ils sont liés soit à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, état sanitaire ...) soit au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat, alimentation).

I.1.4.1. Facteurs intrinsèques

❖ Facteurs génétiques

Des variations importantes sont observées de la composition du lait entre les différentes races laitières et entre les individus d'une même race. D'une manière générale, les races avec de fortes productions donnent un lait plus pauvre en matières azotées et en

matière grasse. Ces dernières sont les plus instables par rapport au lactose (VEISSEYRE, 1979).

❖ **Stade de lactation**

Au cours de la lactation, les quantités de matière grasse, de matières azotées et de caséines évoluent de façon inversement proportionnelle à la quantité de lait produite. Les taux de matière grasse et de matières azotées, élevés au vêlage, diminuent au cours du premier mois et se maintiennent à un niveau minimal pendant le deuxième mois (MEYER et DENIS, 1999).

❖ **Age et nombre de vêlage**

Selon (VEISSEYR, 1979), la quantité de lait augmente généralement du 1^{er} vêlage au 5^{ème}, puis diminue sensiblement et assez vite à partir du 7^{ème}.

Le vieillissement des vaches provoque un appauvrissement de leur lait, ainsi la richesse du lait en matière sèche tend à diminuer.

❖ **Etat sanitaire**

Lors d'une infection, il y a un appel leucocytaire important qui se caractérise par une augmentation de comptage cellulaire induisant des modifications considérables dans la composition du lait (BADINAND, 1994).

Les mammites sont les infections les plus fréquentes dans les élevages laitiers. Et sont à l'origine d'une modification des composants du lait avec pour conséquence, une altération de l'aptitude à la coagulation des laits et du rendement fromager (TOUREAU et *al.* 2004).

I.1.4.2.Facteurs extrinsèques

❖ **L'Alimentation**

L'alimentation joue un rôle important ; elle permet d'agir à court terme et de manière différente sur les taux de matière grasse et de protéines. En effet, selon **COULON** et **HODEN** (1991), le taux protéique varie dans le même sens que les apports énergétiques, qui peut être amélioré par des apports spécifiques en acides aminés (lysine et méthionine). Quant au taux butyreux, il dépend à la fois de la part d'aliment concentré dans la ration, de son mode de présentation et de distribution (finesse de hachage, nombre de repas, mélange des aliments).

❖ **Facteurs climatiques et saisonniers**

Selon **POUGHEON** et **GOURSAUD** (2001), la saison a une influence importante qui se rajoute aux autres facteurs (alimentation, stade de lactation, âge) de façon immuable, le TB (taux butyreux) passe par un minimum en juin – juillet et par un maximum à la fin de l'automne. La teneur en protéines passe par deux minimums un à la fin de l'hiver et l'autre au milieu de l'été et par deux maximums à la mise à l'herbe et à la fin de la période de pâturage.

Camembert



I.2.Camembert

I.2.1.Définition du fromage

Le fromage est le produit frais ou affiné, de consistance solide ou semi solide, dans lequel le rapport protéines de sérum/caséine ne dépasse pas celui du lait et qui est obtenu soit par coagulation complète ou partielle des matières premières suivantes : du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de la crème, de la crème de lactosérum résultant de cette coagulation, et/ou par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou de matière provenant du lait (GILLIS, 1997).

I.2.2.Définition du camembert

Le camembert est un fromage à pâte molle, à égouttage spontané, à caillé non divisé, en forme de cylindre plat d'un diamètre de 10 à 11cm, et de 3cm d'épaisseur, fabriqué exclusivement à partir du lait de vache emprésuré pâte légèrement salée à moisissures superficielles, renferment au moins 40g de matière grasse pour 100g de fromage après complète dessiccation ; et dont le poids total de matière sèche ne doit pas être inférieur à 110g, généralement son poids est de 250g (ECK et GILLIS, 2006).

I.2.3.Classification (frais et affiné)

En fabrication fromagère on peut considérer qu'il existe 7 grandes catégories de technologie (MAHAUT *et al*, 2003) :

- ❖ Les fromages frais ou pâtes fraîches ;
- ❖ Les pâtes molles à croûte fleurie et à croûte lavée ;
- ❖ Les pâtes persillées ;
- ❖ Les pâtes pressées non cuites et cuites ;
- ❖ Les pâtes dures ;
- ❖ Les pâtes filées ;
- ❖ Les fromages fondus.

La figure suivante montre la classification des fromages selon LENOIR *et al* (1983).

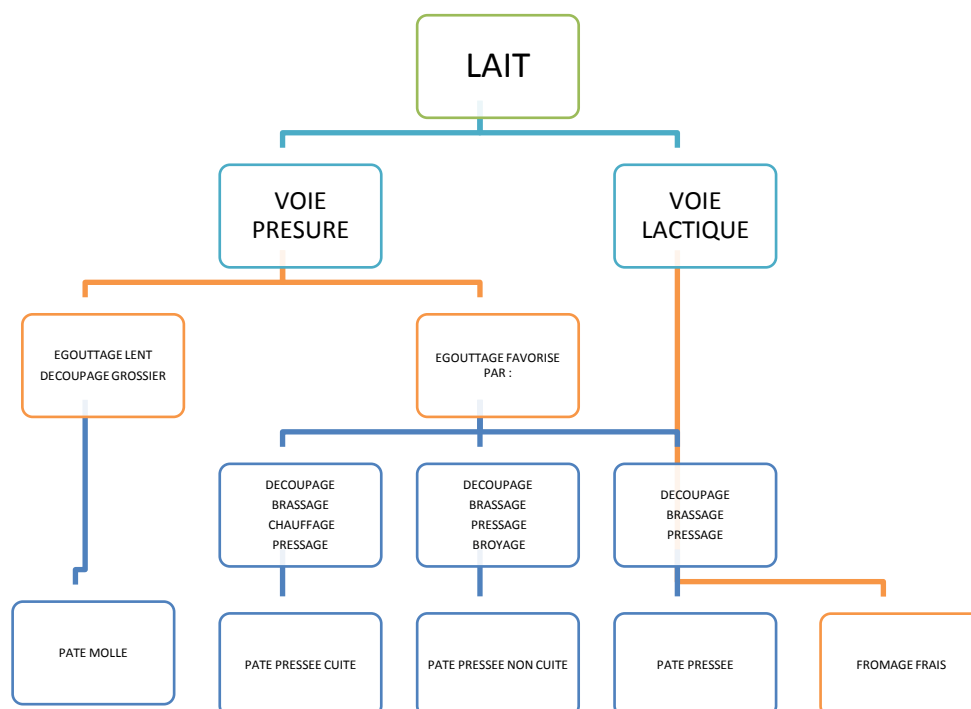


Figure 3 : Classification des fromages selon LENOIR *et al.* (1983).

I.2.4.Composition physicochimique du fromage

Le fromage de type Camembert est riche en protéines, lipides, minéraux et vitamines, le tableau suivant présente la composition moyenne de fromage à pâte molle de type Camembert.

Tableau VI: Composition moyenne de fromage à pâte molle et à croûte fleurie de type Camembert (GUEGEN, 1979).

Eau (g)	Energie	Glucides (g)	Lipides (g)	Protéines (g)	Calcium (mg)	Phosphore (mg)	Magnésium (mg)	Potassium (mg)	Sodium (mg)	Zinc (mg)	Vitamine A (U.I)
50	310	4	24	20	400	250	20	150	700	5	1010

❖ Protéines

Selon leur mode de fabrication, les fromages contiennent de 10 à 30% de protéines. Ce derniers ont pour origine les micelles des caséines modifiées, au cours de l'affinage, une partie qui se trouve dégradée en oligopeptides et acides aminés confèrent au produit final sa texture et sa saveur.

Outre sa teneur élevée en protéines, la haute valeur biologique du fromage lui est conféré par sa composition en acides aminés très intéressant sur le plan nutritionnel (DILLION et BERTHIER, 1997).

❖ Calcium

Les fromages constituent d'excellente source de calcium. Toutes fois, le taux de calcium varie en fonction de la teneur en eau et du mode de fabrication, tout comme le calcium du lait, le calcium du fromage est bien assimilé par l'organisme humain (GUEGEN, 1979).

❖ Vitamines

La teneur en vitamines liposolubles essentiellement A et D, accessoirement vitamine E, est directement fonction de la richesse du produit en lipides, laquelle peut varier de 0% dans certains fromages frais à 70% dans les produits enrichis en crème. Quand à la teneur en vitamines hydrosolubles, celle-ci varie considérablement selon les fromages. En effet, elle est le résultat de facteurs opposés : la perte qui survient au moment de l'égouttage et l'enrichissement qui survient au cours de l'affinage c'est ainsi que les vitamines du groupe B sont en grande partie éliminés avec le lactosérum au cours de l'égouttage et que la vitamine C est intégralement éliminée (ECK et GILLIS, 2006).

❖ Lipides

Les lipides conditionnent l'onctuosité de la pâte du fromage. Au cours de la maturation se produit, sous l'influence de lipases microbiennes, une lipolyse limité avec formation d'acide gras libres, certains de ces acides gras libres sont volatils est interviennent dans la formation de l'arome. Les lipides du lait se trouve dans le lait sous forme émulsionnée, ce qui les rend plus digestibles (DILLION et BERTHIER, 1997).

❖ Sodium

Le salage du caillé est employé pour plusieurs raisons, outre le fait que le chlorure de sodium intervient pour révéler la saveur du fromage, on l'utilise pour limiter la prolifération de certaines moisissures indésirables et pour régler l'humidité du caillé (ECK et GILLIS, 2006).

I.2.5.Fabrication fermière

I.2.5.1.Fromage fermier

Le qualificatif fermier ou toute indication laissant entendre une origine fermière du fromage est réservé aux fromages fabriqués par des producteurs transformant exclusivement le lait produit sur leur propre exploitation (LUQUET, 1990).

I.2.5.2.Les fromages au lait cru

L'utilisation de lait cru ou pasteurisé pour la production de fromages a un impact sur la flaveur du produit fini. En effet, il a été démontré que les fromages faits à partir de lait cru présentent une quantité plus importante de composés d'arôme par rapport au fromage fait de lait pasteurisé (BEUVIER et BUCHIN, 2004).

La destruction des enzymes présentes dans le lait par la pasteurisation serait responsable d'une partie de cet impact marqué sur les propriétés sensorielles du produit final (BEUVIER et BUCHIN, 2004). Par exemple, l'asparaginase et la glutaminase sont dénaturées lors de la pasteurisation (MARILLEY et CASEY, 2004).

Une augmentation de la diversité des chemins métaboliques (par une plus grande diversité des espèces) et une accélération de l'affinage (par une plus grande quantité de microorganismes de la microflore secondaire) dans le fromage au lait non pasteurisé contribuent grandement à la production d'arômes. Il y aurait d'avantage de protéolyse secondaire (ex d'acides aminés libres) et de lipolyse dans les fromages au lait cru. Il en est de même pour les composés volatils, les alcools, les esters et les composés soufrés (MARILLEY et CASEY, 2004).

I.2.6.Technologie de fabrication du camembert

La fabrication de fromages comprend 4 grandes phases :

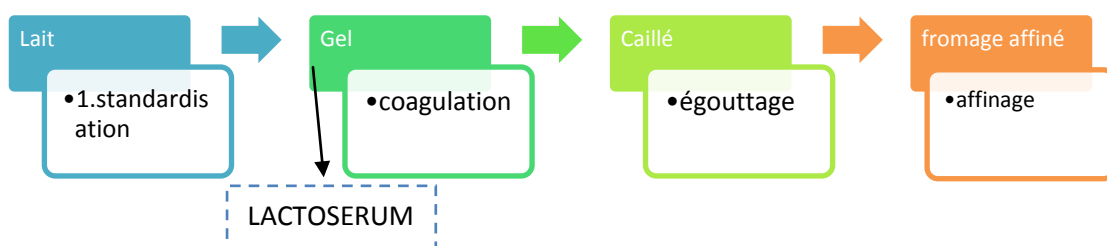


Figure4 : Etapes de fabrication du fromage (MAHAUT, 2003).

La fabrication d'un fromage, selon les méthodes traditionnelles comprend trois étapes successives (MIETTON et *al*, 1994) :

I.2.6.1. La coagulation du lait

Avec formation du gel ou coagulum : formation d'un réseau protéique de caséine retenant la matière grasse et une partie de la phase aqueuse (le lactosérum). Cette coagulation se fait, pour la majorité des fromages, par voie enzymatique (chymosine contenue dans des présures animales, ou les préparations enzymatiques végétales ou microbiennes).

➤ Mécanisme de la coagulation

La coagulation se traduit par la formation d'un gel (ou coagulum) qui résulte dans le cas du Camembert, des modifications physico-chimiques qui interviennent autour des micelles de caséines et qui concourent à leur déstabilisation extrême.

Cette déstabilisation est réalisée soit par voie fermentaire à l'aide des bactéries lactiques, soit par voie enzymatiques à l'aide d'enzymes coagulantes.

Dans le cas de la coagulation acide (provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne), l'abaissement du pH induit la solubilisation du calcium et du phosphate inorganique. Par équilibre, le pont salin dégarni peu à peu les micelles. Ces dernières, vont se lier entre-elles et former un gel cassant, très friable et peu élastique. (MIETTON, 1995).

La coagulation enzymatique est quant à elle due à l'action de la présure qui est une enzyme protéolytique provenant de caillettes de veaux non sevrés. Cette enzyme correspond en réalité à deux fractions actives : l'une majeure (80 %), constituée par la chymosine, l'autre mineure (20 %), est représentée par la pepsine. Il a été établi qu'au cours de la coagulation enzymatique, la présure en hydrolysant la caséine κ au niveau de la liaison (Phe105- Met106), induit une déstabilisation des micelles de caséines qui vont peu à peu flocculer pour former un gel ferme, compact et ayant une bonne cohésion. (ECK, 1990).

Pour les fromages à pâtes molles, la coagulation est généralement mixte. Elle est provoquée par l'action conjuguée de la présure (coagulation enzymatique) et les bactéries lactiques (coagulation acide).

I.2.6.2. L'égouttage du gel séparation d'une partie du lactosérum, après rupture mécanique du coagulum, par moulage et, dans certains cas, pression ; il conduit à l'obtention du caillé.

I.2.6.3. L'affinage du caillé : des transformations (enzymatiques, fermentations). A l'issue de cette étape, le fromage acquiert ses caractéristiques organoleptiques spécifiques.

A chacune des trois étapes suscitées, des microorganismes sont impliqués. Les bactéries lactiques interviennent dès les premières étapes (coagulation, égouttage). De nombreux autres microorganismes (levures et moisissures par exemple) interviennent au cours de l'affinage et ce sont essentiellement les enzymes d'origine microbienne qui interviennent au cours de cette dernière étape.

*Biochimie et microbiologie
de l'affinage*



I.3. Etude de la phase d'affinage

I.3.1. Généralité sur l'affinage

L'affinage du fromage est une période de maturation pendant laquelle les propriétés sensorielles des fromages se développent grâce à une variété de réactions biochimiques comme l'utilisation des sucres, des acides organiques, des protéines et des lipides du caillé (MOLIMARD, 1996). Les enzymes naturelles du lait (plasmine, lipoprotéines, phosphatases, protéases), les enzymes coagulantes (pepsine, chymosine) et les enzymes protéolytiques et lipolytiques microbiennes (provenant des ferments lactiques et des agents d'affinage) participent grandement à l'apparition des propriétés organoleptiques des fromages. La composition intrinsèque du fromage (pH, aw) et les facteurs environnementaux (température, humidité relative, débit d'air, composition atmosphérique dans le hâloir) ont également une grande influence sur le développement de l'apparence et des propriétés sensorielles de fromages de par leur action sur la croissance microbienne et l'activité enzymatique (VAN DEN TEMPEL, 2000). La durée d'affinage varie selon le fromage, elle dure quelques semaines à deux ans ou plus à des températures spécifiques pour les différents types de fromages (FOX *et al*, 1994).

I.3.2. Facteurs d'affinage

L'affinage des fromages est une grande partie tributaire des enzymes, qui sont surtout d'origine microbienne. Tous les facteurs qui touchent le développement des microorganismes, la production d'enzymes et l'activité enzymatique auront des effets importants sur le déroulement de l'affinage. Les principaux facteurs sont les suivants :

❖ Température

La température est l'un des facteurs importants à contrôler lors de l'affinage puisque pour un fromage donné, l'activité microbienne et enzymatique varie selon la température. Pour l'ensemble des microorganismes utilisés en fabrication fromagère et pour la plupart des enzymes engagés dans l'affinage, les températures optimales sont supérieures à 20°C (MIETTON, 1995).

❖ Humidité

La teneur en humidité influence la vitesse de l'affinage, ainsi, les pâtes molles sont le siège d'une fermentation et d'une transformation plus rapide que les pâtes ferme.

❖ pH

Le pH influence le développement microbien et l'activité enzymatique. Parmi les microorganismes, seul les bactéries lactiques, les levures et les moisissures peuvent se développer à des pH inférieurs à 5. L'activité des enzymes est aussi très sensible aux variations de pH (MIETTON, 1995).

❖ composition de l'atmosphère

La composition de l'atmosphère peut intervenir dans le processus d'affinage. Les besoins en oxygène des microorganismes sont variables, la teneur en oxygène devient donc importante pour les fromages dont l'affinage se fait principalement en surface (CHOISY *et al*, 1984).

I.3.3.Agents d'affinage des fromages

Les agents responsables de l'affinage des fromages sont les enzymes. Selon FOX *et al*. (1993) quatre ou éventuellement cinq agents sont impliqués dans la maturation des fromages :

I.3.3.1.Enzymes du lait

- ❖ La plasmine qui est une protéase thermorésistante, elle intervient dans les fromages à pâtes pressée cuite et non cuite à l'affinage lent ;
- ❖ La phosphatase alcaline : détruite par la pasteurisation, elle aurait un rôle uniquement dans les fromages issues de lait cru ;
- ❖ la lipase : enzyme thermolabile, elle n'intervient que dans les fromages au lait cru. Elle hydrolyse préférentiellement les acides gras à courte chaîne. Son action est plus marquée dans le lait de brebis et de chèvre que de vache car les globules gras sont plus petits ; elle conduit à des fromages plus typés.

I.3.3.2.Enzymes coagulantes

La présure (mélange de chymosine et pepsine), agent coagulant ajouté au lait a une activité de protéolyse générale. Son activité est dominante dans les fromages à pâte pressée non cuite. Les produits formés sont principalement des peptides de poids moléculaire élevé.

I.3.3.3.Enzymes d'origine microbienne

La majorité des bactéries isolées de fromages à pâte molle ont le potentiel de contribuer à l'arôme des fromages en dégradant les lipides, les protéines et les acides aminés à l'aide de différentes enzymes microbiennes.

I.3.3.4.Bactéries lactiques

Apportées par les levains, elles transforment le lactose en acide lactique. On distingue :

- ❖ Les lactocoques : flore dominante dans les pâtes molles et pâtes pressés non cuits ; ils ont une action protéolytique ;
- ❖ Les lactobacilles et streptococcus thermophiles : ils exercent une action d'acidification et de protéolyse ;
- ❖ Les leuconostocs : ils produisent, à côté de l'acide lactique, des composants d'arômes.

I.3.3.5. Levures

La plus couramment rencontrée est *Geotrichum candidum* ; elle se développe en surface des fromages en consommant l'acide lactique, produisant de l'éthanol et exerçant des actions lipolytiques et protéolytiques.

I.3.3.6. Moisissures

Les deux plus courantes sont *penicillium camemberti*, qui est une moisissure de surface des pâtes à croûte fleurie, et *penicillium roqueforti*, moisissure interne des pâtes persillées. Elles possèdent les enzymes les plus lipolytiques, à l'origine de la formation de méthylecétones, d'alcool secondaires sont aussi dotés d'activité protéolytique.

I.3.4. Les modifications biochimiques au cours de l'affinage

La biochimie de l'affinage peut être subdivisée en processus primaires et processus secondaires de dégradation. Le processus primaire comporte : la fermentation du lactose résiduel, de l'acide lactique et de l'acide citrique, ainsi que la dégradation des protéines et des lipides. Suite à ces événements primaires, d'autres événements biochimiques secondaires prennent place et sont très importants pour le développement des composés aromatiques. Le processus secondaire concerne donc la dégradation des acides aminés et des acides gras (MC SWEENEY, 2004). La figure 5 rassemble les principales réactions enzymatiques de l'affinage des fromages.

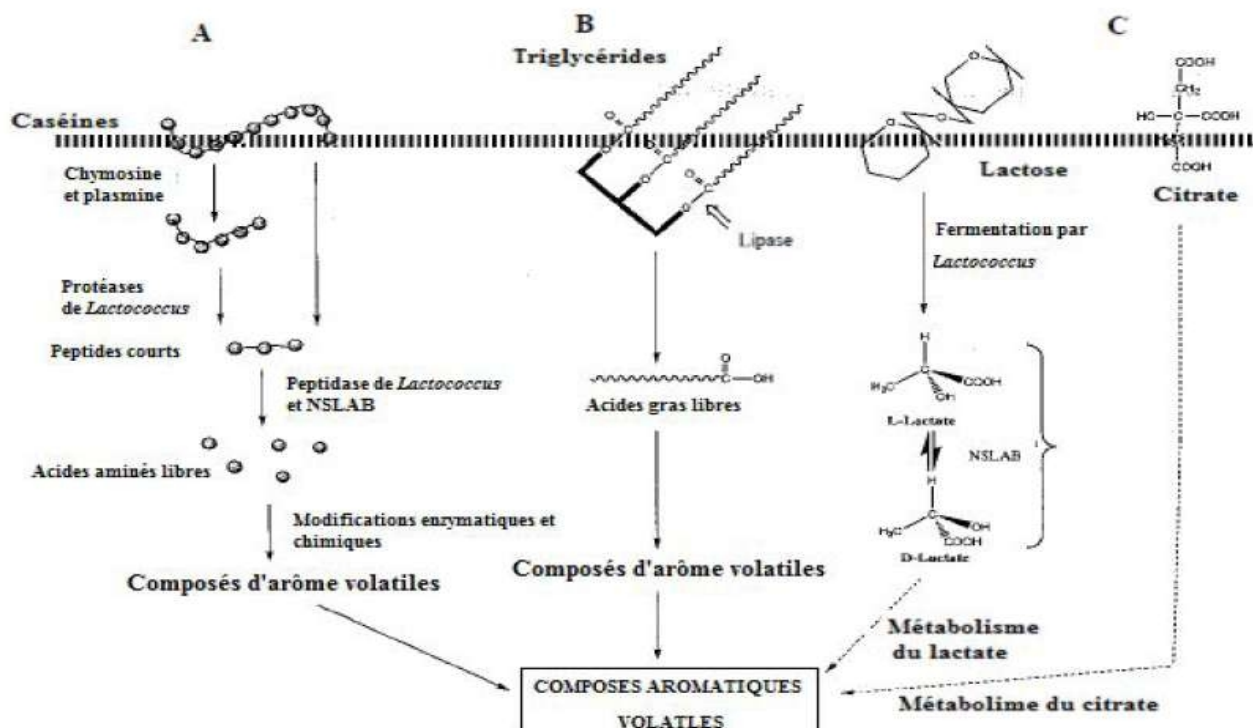


Figure 5 : principaux mécanismes biochimiques de l'affinage (MCSWEENEY et SOUSA ,2004)

(A) protéolyse (B) lipolyse (C) métabolisme de lactose, de lactate et de citrate.

I.3.4.1. Fermentation du lactose

L'acide lactique, produit de dégradation du lactose par les microorganismes est un substrat de plusieurs réactions de l'affinage des fromages. Ce diholoside est clivé par la β galactosidase en glucose et galactose. Ces deux sucres sont ensuite dégradés selon la voie principale des hexoses phosphates (voie d'Embden-Meyerhoff) et secondairement selon la voie des pentoses phosphates. (ALAIS et LINDEN, 1997). L'acide lactique subit d'autres fermentations produisant l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide butyrique et le CO₂. Ces produits peuvent être transformés en composants de flaveur comme les aldéhydes et les cétones (MCSWEENEY, 2004).le tableau suivant représente les principaux effets de la glycolyse sur la qualité des fromages.

Tableau VII: principaux effets de la glycolyse sur la qualité des fromages (SERHAN, 2008).

Enzymes ou voies métaboliques	Source d'enzymes	Substrat majeur	Molécules produites	Descripteur sensoriel
β -galactosidase	Bactéries lactiques	Lactose	Glucose Galactose Acide lactique (post acidification)	Acide Cœur dur, blanc Texture sèche
Voie homo-fermentaire	Bactéries lactiques	Glucose Galactose	Lactates Acide lactique (post acidification)	Acide Cœur dur, blanc Texture sèche
Voie hétéro-fermentaire	Leuconostocs	Glucose Galactose	Lactates Ethanol Acétate CO ₂ Acide lactique	F ermenté Alcoolisé Acide
Voie du citrate	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> Leuconostocs	Citrate	Acétate Diacétyl Acétoine CO ₂	Fermenté Alcoolisé Noisette, Acide
Voie du propionate	<i>Propionibacterium</i>	Lactate	P ropionate, acide gras, acide acétique Acétate	A cide Arôme d' <i>Emmental</i>

I.3.4.2. Lipolyse

La lipolyse est un phénomène limité qui participe positivement à l'élaboration des qualités gustatives des fromages. Les enzymes lipolytiques dans les fromages proviennent du lait, de la présure et des microorganismes. Le lait contient une lipase lipoprotéique (LPL) qui reste assez active dans les fromages au lait cru. D'autre part plusieurs microorganismes peuvent intervenir dans la lipolyse des fromages comme principalement les moisissures et les microcoques (ALAIS et LINDEN, 1997). Les bactéries lactiques sont dotées d'endolipases qui activent dans les fromages après lyses des cellules (MCSWENEY, 2004). Les changements dans la saveur et l'arôme des fromages sont attribués à la lipolyse selon la teneur en acides gras libérés cette lipolyse coupe les liaisons esters triacyl glycérols produisant des acides gras libres, des mono et diacyl glycérols (COKER et al, 2005). Il faut noter qu'un taux de lipolyse élevé induit l'apparition de goût de rance et de savon dans le fromage (CHILLIARD et LAMBERET, 1987). Suite à l'ensemble des réactions de dégradation des constituants du caillé, différentes modifications apparaissent dans le fromage affectant directement ses propriétés organoleptiques dont principalement l'arôme et la texture.

I.3.4.3. Protéolyse

La protéolyse apparaît comme l'un des phénomènes majeurs pendant l'affinage des fromages et c'est le plus complexe (MCSWENEY, 2004). Elle contribue à la texture des pâtes, au goût, à l'ouverture et au croûtage par dégradation biochimique des protéines (COURROYE, 1987). Cette dégradation est réalisée par les systèmes enzymatiques des microorganismes, des enzymes coagulantes et des enzymes du lait.

La protéolyse est une hydrolyse des liaisons peptidiques qui entraîne l'apparition à partir de la protéine de départ, des peptides et/ou des acides aminés libres. La protéolyse dans le cas du camembert n'est pas uniforme, elle est beaucoup plus profonde en surface qu'à l'intérieur, les produits de dégradation ont tendance à migrer vers le centre du fromage (VEISSEYRE, 1975).

Au cours de la maturation du Camembert dans les hâloirs, il y a hydrolyse enzymatique progressive des caséines en peptides (de tailles variables) et en acides aminés libres. On peut le schématiser en trois étapes :

- Découpage des longues chaînes peptidiques de la caséine par les protéinases engendrant des peptones et des peptides ;
- Dégradation hydrolytiques des peptones et des peptides par les aminopeptidases et les carboxyl-peptidases. Les produits de l'hydrolyse sont des peptides de faible poids moléculaire et des acides aminés ;
- La dégradation des acides aminés en hydroxy et cétoacide avec dégagement simultané d'ammoniaques découle des réactions désamination.

Les réactions de décarboxylations des acides aminés provoquent la libération de CO₂ et d'amine (ALAIS, 1988). La figure suivante explique le mécanisme de catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromages.

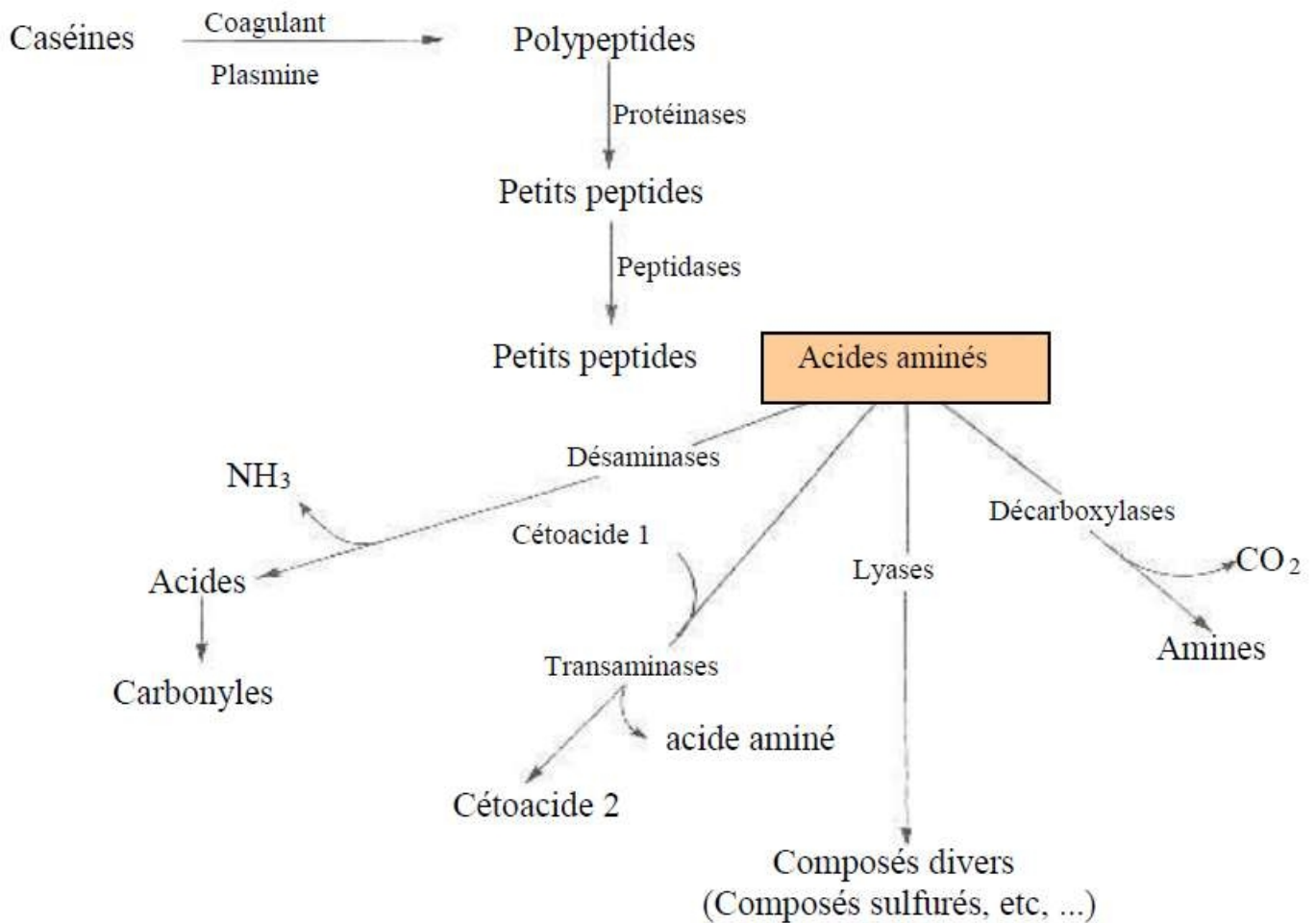


Figure 6: protéolyse des caséines et catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromages (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

I.3.4.3.1. Peptides bioactifs

L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait peut libérer des fragments capables d'exercer des activités biologiques, telle que l'anti hypertension, anti microbien, antioxydant, immunomodulant. Les fragments de protéines, connus sous le nom de peptides bioactifs (KUNENE et al, 2000).

Au cours de l'affinage les protéines sont dégradées par les protéases et la présure naturellement présente dans le lait ainsi que par les protéinases et les peptidases de microorganismes proteolityques. au cours de ce processus, il y a formation de peptides bioactifs. Les produits laitiers sont actuellement considérés comme des principaux fournisseurs de peptides bioactifs, même si d'autres protéines de provenance animale, et même de protéines végétales, contiennent également des séquences potentiellement bioactives (WALTHER, 2006).

❖ Peptides antibactériens

Des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine αS_2 sont capables d'inhiber la croissance de différentes souches bactériennes. Un ensemble de peptides, issus de l'hydrolyse de la caséine αS_2 par la chymosine et nommés casocidines, inhibent la croissance de *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (LAHOV et REGELSON, 1996). La casocidine I (CN as1 -(f165-203) inhibe la croissance d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus carnosus* (ZUCHT et al, 1995).

D'autres activités biologiques ont été découvertes dans les hydrolysats de caséines comme des activités antioxydantes grâce à leur richesse en certains acides aminés comme l'Histidine ou en acides aminés hydrophobes. Les peptides dérivés de ces protéines sont capable d'inhiber la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux libres (KULLISAR et al, 2003).

I.3.5. Microbiologie de l'affinage

La production de fromages, surtout ceux à base de lait cru, est fortement liée au terroir, par le biais de la composition du lait tant dans sa composante biochimique que microbiologique. Cette composante microbienne joue un rôle déterminant sur les qualités sensorielles des fromages. L'écosystème fromager est une véritable source de biodiversité du fait de la composition de sa flore microbienne. En effet, bactéries, moisissures et levures cohabitent sur la croûte et à l'intérieur même du fromage (MICHEL et al, 2005).

I.3.5.1. Flores bactériennes

La flore bactérienne utile des fromages à pâte molle comprend deux grands groupes : les bactéries lactiques et les bactéries de surfaces (non lactiques) (PELAEZ et REQUENA, 2005).

I.3.5.1.1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (BADIS et al., 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5.

Elles sont les premières espèces microbiennes à se développer dans le lait et le caillé et en modifiant les caractéristiques du milieu elles préparent les conditions de développement des autres espèces responsables de l'affinage (essentiellement levures et moisissures) les bactéries lactiques ont en commun l'aptitude à produire de l'acide lactique en quantité importante à partir du lactose (fermentation lactique) (LARPENT, 1987).

❖ Intérêts technologiques des bactéries lactiques

- 1) **Activité acidifiante (production d'acide lactique) :** Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques permet la coagulation du lait (en facilitant l'action de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé; la participation aux propriétés rhéologiques du produit final; l'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (PAPAMANOLI et *al*, 2003).
- 2) **Activité protéolytique :** Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (BUIST et *al*, 1998).
- 3) **Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux :** Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, l'acétone et le diacétyle sont les plus importants (GEORGALAKI et *al*, 2002, FRANÇOIS et *al*, 2007).
- 4) **Activité bactériostatique (production de bactériocines) :** Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique appelées bactériocines. Cette caractéristique est utilisée industriellement pour la destruction des bactéries indésirables et pathogènes dans la fabrication d'aliments comme la nisine produite par les lactocoques dirigée contre *Bacillus* et *Clostridium*, la plantaricine et la sakacine produites toutes les deux par les lactobacilles actives sur *E. coli*, *Listeria* et certaines levures (OGUNBANWO et *al.*, 2003 ; ZAMBUNELLI et CHIAVARI, 2002), contribuant ainsi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptique du fromage (HARRIS et *al.*, 1989 ; GEORGALAKI et *al.*, 2002).

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-négatif. Ces substances vont interagir avec des récepteurs de peptidoglycane en provoquant l'augmentation de la perméabilité de la membrane et par conséquent, la mort cellulaire. Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (DORTU et THONART, 2009).

I.3.5.1.2. Bactéries de surface

La flore bactérienne technologique non lactique est retrouvée à la surface de différents types de fromages, comme les pâtes molles (camembert). Les bactéries d'affinage appartiennent en grande partie, aux groupes des staphylocoques et des bactéries corynéformes (GOERGES et *al*, 2008).

Les staphylocoques non pathogènes coagulase négative et les bactéries corynéformes possèdent en commun certains caractères physiologiques qui expliquent leur aptitude à s'implanter à la surface des fromages : elles sont le plus souvent aérobies, mésophiles, halotolérantes, acidosensibles, ne pouvant se développer que dans une zone de pH proche de la neutralité (6 à 8,5).

I.3.5.2.Flores fongiques

I.3.5.2.1.Levures

Plus de cinquante espèces de levures différentes ont été répertoriées comme microflore naturelle dans les fromages. Elles sont en général très tolérantes aux faibles pH et peuvent se développer jusqu'à la neutralité. Certaines de ces espèces sont sélectionnées comme ferments d'affinage et sont ajoutées au lait à une concentration variant (LECLERCQ-PERLAT, 2004). Les principales levures retrouvées dans les fromages à pâte molle appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Yarrowia*.

G. candidum est utilisée comme ferment d'affinage pour les fromages à pâte molle et à croûte fleurie, comme le Camembert et contribue à ses saveurs typiques par la production d'alcools secondaires, de méthylcétones et de composés soufrés (BOUTROU et GUEGUEN, 2005). *G. candidum* produit aussi des composés volatils soufrés qui sont les précurseurs d'arômes de chou et d'ail (DEMARIGNY, 2000). Cette espèce possède un fort potentiel lipolytique et protéolytique. *G. candidum* utilise notamment le glucose, le lactate et le galactose comme source de carbone et d'énergie, mais est incapable d'utiliser le lactose.

❖ La croissance des levures à la surface des fromages

L'affinage des fromages est caractérisé par une succession de flores microbiologiques (SPINNLER ET GRIPON ; 2004). Ils rapportent que les levures se développent pendant et après la période d'acidification par le ferment lactique. Elles entraînent donc une modulation de la cinétique du pH en terminant la consommation du lactose.

À la surface des fromages à pâte molle, la population totale de levures peut facilement atteindre 10^6 - 10^8 ufc/cm² pendant les cinq premiers jours de l'affinage et demeurer constante jusqu'à la fin de vie du produit (LARSEN et al, 1998).

I.3.5.2.2.Moisissures

En fromagerie, les deux principales espèces de *Penicillium* utilisées pour leurs caractères technologiques sont *P. camemberti* et *P. roqueforti*. Elles sont respectivement utilisées pour les fromages Camembert et les fromages bleus. *Penicillium camemberti* est une moisissure filamenteuse qui confère aux fromages à pâte molle et à croûte fleurie leur aspect blanc uniforme et duveteux.

P. camemberti est une moisissure qui peut croître à des températures de 4 à 37 °C, à un pH entre 2 et 8,5 (avec un optimum entre 3,5 et 6,5), des caractéristiques générales de croissances similaires à celles de *P. roqueforti* (ABBAS et al, 2011).

Penicillium camemberti est la moisissure blanche qui est responsable non seulement de l'apparence caractéristique des fromages à pâte molle tels que le Camembert et le Brie,

mais également des saveurs associées à ces types de fromages affinés. De par sa consommation d'acide lactique et de production de NH_3 , un des rôles de *P. camemberti* dans l'affinage du Camembert est de permettre un gradient de pH à partir de la croûte et ce, jusqu'au centre du fromage (LEGRAET et al, 1983). Également, *P. camemberti* participe activement, par la dégradation d'acides aminés et d'acides gras libres, à la protéolyse et à la lipolyse dans les fromages. Ces activités permettent la production de composés aromatiques comme de l'ammoniac, des métylcétones, des alcools, des esters, des aldéhydes, des lactones et composés soufrés (JOLLIVET et al, 1993).

❖ Evolution des moisissures au cours de l'affinage

G. candidum se développe dès les premiers jours de l'affinage alors qu'il faut attendre près de 7 jours pour voir apparaître *P. camemberti* à la surface des fromages. Lors de l'association de ces deux organismes, un grand bénéfice est ajouté aux fromages Camembert en termes de colonisation de la surface. En effet, la croissance rapide de *P. camemberti* en combinaison avec *G. candidum* protège la qualité des produits en limitant les contaminations extérieures, en plus de permettre un temps d'affinage plus court que si les souches étaient utilisées seules (BOUVIER et al ; 1995).

I.3.6. Les défauts d'affinage

I.3.6.1. défauts de saveur et d'arome

Un défaut fréquent rencontré dans les fromages de type pâte pressé et pâte molle c'est l'amertume. Ce sont les caséines et surtout la caséine β qui sont à l'origine des peptides amers. Aussi le goût rance, il apparaît lorsqu'une lipolyse excessive donne naissance à une quantité élevée d'acides gras libres à chaîne courte et moyenne (MAHAUT, 2000).

I.3.6.2. Défauts de texture et de gonflement

Un fromage « plâtreux » lorsque le cœur du fromage reste blanchâtre ferme et acide. Ce phénomène est attribué à un égouttage prononcé. Ce défaut est fréquent quand les ferments lactiques provoquent une acidification rapide, entraînant une synérèse trop accentuée (MAHAUT, 2000). la pâte devient sèche ou coulante et le gonflement soit précoce ou tardif qui se produise après le début de fabrication.

I.3.6.3. Défauts d'aspect et de croutage

- Défaut de graissage : l'agent responsable de la graisse ou peau de crapaud, sur le camembert de lait cru est *Geotricum candidum* (ECK, 1990). La graisse apparaît 1 semaine, voire 2 à 3 jours après démoulage et souvent en ambiance froide et humide. Au toucher, surface poisseuse, colle au doigt et laisse sensation d'humidité, de graisse. Fromage ne parvient pas à sécher. à l'observation, surface plutôt transparente et ressemble à un gel fin. Présence possible de points ou surfaces colorées (orangées). odeur parfois imperceptible mais peut aussi être repoussante (forte : alcool, hydromel). en bouche, fromage amer.

- Poil de « chat » : les champignons responsables de l'accident du poil du chat sur les fromages à pâtes molles. (ECK, 1990) touffes gris clair, marron – noir. poils longs ou courts. Apparition possible dans les trois premiers jours de la fabrication .dans les milieux humides .Souvent associé à des changements (climatiques, travaux...).

Matériel et Méthodes



Cette étude a été menée dans le but de faire une comparaison entre le fromage artisanal et industriel et de suivre l'évolution de la microflore au cours de l'affinage ainsi que la détection des pathogènes et la recherche d'une éventuelle activité antimicrobienne et anti-oxydante des fromages à pâte molle type camembert fabriqué au sein de la laiterie STLD de Tizi Ouzou et la fromagerie artisanale de Ouacif « saint amour ». Les analyses physicochimiques ont été effectuées au sein du laboratoire interne de la laiterie STLD ainsi que les analyses microbiologiques (suivi de la microflore) par contre l'autre partie des analyses (dosages des protéines, de l'acidité pour les fromages, l'activité anti-oxydante et l'activité antimicrobienne) ont été effectuées au niveau de laboratoire de microbiologie de l'Université de Mouloud Mammeri Tizi Ouzou.

II.1. Présentation de l'unité STLD

La laiterie EURL STLD « société de transformation du lait et dérivés » a été créée le 16 avril 2004 c'est une entreprise à caractère privée située à la rue des frères BEGGAZ nouvelle ville Tizi Ouzou. L'unité compte un effectif de 99 employés compétents, ambitieux, qualifiés et bien formés aux pratiques indispensables dans une industrie agro-alimentaire. Le lait cru collecté par des éleveurs locaux utilisé pour produire une large gamme de produits, environ 70000 litres sont transformés par jour. Utilisation de lait de vache cru, lait de chèvre cru, ferments lactiques, présure, chlorure de calcium, sel comme matières premières pour fabriquer :

- ❖ LE FERMIER /fromage à pâte molle (camembert)
- ❖ LE BRIE DE FERMIER /fromage à pâte molle
- ❖ LE PROVINCIAL /fromage à pâte molle à croûte lavée
- ❖ LE CHEVRE DU FERMIER /fromage à pâte molle
- ❖ fromage à pâte pressée
- ❖ lait pasteurisé conditionné et L'ben

L'unité constitue de 2 équipes avec durée de travail 2x8 et production fromages semi automatique, concernant les machines l'unité possède deux conditionneuses à lait (l'ben) 2500 l de l'heure et pasteurisateur 7000 l de l'heure. Les compartiments de l'unité :

- Service administratif
- Service commercial
- Salle de réception des collectes du lait
- Laboratoires d'analyses microbiologiques et physicochimiques
- Salle de pasteurisation
- Atelier de conditionnement
- Atelier d'emballage
- Magasin de stockage
- Salle de nettoyage et de désinfection du matériel de production
- Cantine

Sur le marché actuel la concurrence est limitée vu que l'unité travaille à base de 100 % lait de vache cru (pas de mélange de poudre de lait).

II.2.Présentation de la fromagerie artisanale « saint amour »

« Saint amour », c'est une fromagerie créée par deux éleveurs de la famille AIT ABDELMALEK en 2000, située au sommet de la montagne dans la commune d'Ouacif Dans le village de Bou Abderrahmane.

Ils exerçaient à l'origine l'activité d'élevage en valorisant leurs produits (le lait et les fromages....).Ils suivaient alors les recettes d'un livre qu'il avait ramené de leurs visite au salon de l'agriculture à Paris: « Comment faire son fromage à la maison ». Ils repartent tout de même en 2007, de zéro, grâce à l'aide de plusieurs de leurs proches et de l'association AMSED (Association Migrations Solidarités et Échanges pour le Développement) basé sur Strasbourg. L'AMSED a organisé plusieurs formations de fabrication de fromage en Kabylie et a aidé le couple à se doter d'une fromagerie (servant également de fromagerie école pour les formations) et du matériel nécessaire pour la fabrication (méthode artisanale).

D'après notre visite à l'unité, on a constaté que cet éleveur ne dispose pas de matériel moderne ou mécanisé pour cette activité, tout est manuel y compris la traite.

Aujourd'hui, ils possèdent 11 vaches (de races provenant d'un mélange d'Holstein canadienne, de Simmental et de montbéliarde) et une vingtaine de chèvres (de race alpine et Saanen).L'ensemble des deux troupeaux est traité à la main pour produire des fromages frais, demi-frais, St Marcelin, des tommes de chèvre, de vache et des demi-chèvre (demi-vache),reblochon, chevrehon, opoivre affiné, camembert, le beurre, yaourts, différentes confiture comme confiture de lait et autre produits .

Pour la production du lait, l'unité produit 200litres/jours du lait de vache et 100litre/jour de lait de chèvres .ils arrivent en moyenne à réaliser 3 modèles de produits/ jour. Les produits sont affinés et stockés dans la chambre froide. Chaque produit et chaque type de fromage a une durée spécifique de stockage pour être affiné.

Les fromages sont principalement commercialisés sur la ville d'Alger, sous le nom de Saint Amour.ils sont les fournisseurs de l'hôtel « SOFITEL » beaucoup plus, de restaurant algérois « UNIVERSITE », hôtel restaurant « MESQUELIL » et de différents magasin, ils ont exposé à l'ambassade de France, Portugal, USA, Venezuela, chili, suisse, Syrie.....

II.3. Matériel et méthodes

II.3.1. Echantillonnage

L'étude a été réalisée et basée sur le suivi de 3 échantillons appartenant à 3 lots de productions différentes du camembert du lait de vache et une étude comparative entre le fromage industriel et artisanal.

Les échantillons concernés sont comme suit :

- ✓ Lait cru (fromage artisanal) et lait pasteurisé (fromage industriel) : chaque échantillon est composé de 250ml ;
- ✓ Un échantillon de 3 pièces de 250g du camembert aux différents stades d'affinage (1^{er}, 5^{ème}, 9^{ème}) pour le fromage industriel et (1^{ère}, 6^{ème}, 12^{ème}) pour le fromage artisanale.

II.3.2. processus de fabrication du camembert au niveau de la laiterie STLD de Tizi Ouzou

L'Unité de production STLD fabrique le fromage à pâte molle (camembert) à partir de lait cru collecter localement (Freha et Bouzguene), les étapes de transformation du lait en camembert sont illustrées dans la figure 7.

- **Pasteurisation** : Les laits passent dans un pasteurisateur réglé au barème de 75 °C pendant 20 secondes.
- **Maturation** : Cette étape est indispensable pour que le lait puisse atteindre une acidité de 23-24 ° D à une température de 37 ° C, par l'ensemencement avec des levains lactiques pendant 30 min, également pour rétablir l'équilibre salin du lait en ajoutant le chlorure de calcium CaCl₂ à raison de 1%.
- **Emprésurage du lait et coagulation** : Pour les fabrications fromagères à partir du lait frais, la quantité de présure est de 2 à 3%.
- **Décaillage et le brassage** : Après coagulation, le caillé est découpé en petit cubes grâce à des grilles « tranche caillé », ce qui va libérer le lactosérum puis des brassages successifs sont effectués pour faciliter la remontée du sérum lequel sera soutiré.
- **Moulage et égouttage** : Le caillé brassé est mis dans des moules laissant échapper le sérum, qui seront acheminés ensuite dans la salle à égouttage ou on procède à deux retournement après 45 minutes et 2 heure de temps et dans le cas où le caillé est humide un troisième retournement permet d'avoir une meilleure exsudation du lactosérum.
- **Salage et ressuyage** : Après démoulage, le salage est effectué en utilisant des saumures ayant une concentration en sel entre 150 à 170 g/l pendant 35 à 40 minutes. Après salage, les fromages sont envoyés dans une salle de ressuyage pour une durée de 24 heures à une température de 12 °C, en effectuant un retournement.
- **Affinage** : Les fromages sont introduits dans des hâloirs à une température de 12 °C pendant une durée de 9 jours, durant cette période les fromages sont pulvérisés de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum*, en effectuant des retournements tous les deux jours.

II.3.3.processus de fabrication du camembert au niveau de la fromagerie artisanale « saint amour »

Les étapes de transformation du lait cru en camembert (artisanale) sont illustrées dans la figure 7.

- **La traite** : s'effectue deux fois par jour, tôt le matin et le soir, l'hygiène de la traite et tant aussi importante que dans la fromagerie.
- **Chauffage** : est effectué à 37°C afin de mettre les bactéries lactiques en condition de température favorable.
- **Emprésurage du lait et coagulation** : l'ajout de la présure (5gouttes/litre) qui provoque la gélification du lait en coupant la caséine. Après commence la phase de coagulation ou caillage.
- **Découpage ou Décaillage** : qui consiste la tranché en petits morceaux de 4 à 5 cm afin d'accroître la surface d'exsudation du lactosérum puis sont soumis à un brassage.
- **Moulage** : mise en moule pour donner la forme finale aux fromages, le 1ere retournement après 2heure et le 2eme après 7heures.
- **Salage** : à sec avec saupoudrage à la main par frottage après 24heures de moulage.
- **Affinage** : introduction dans des hâloirs à température de 16°C pendant 12 jours

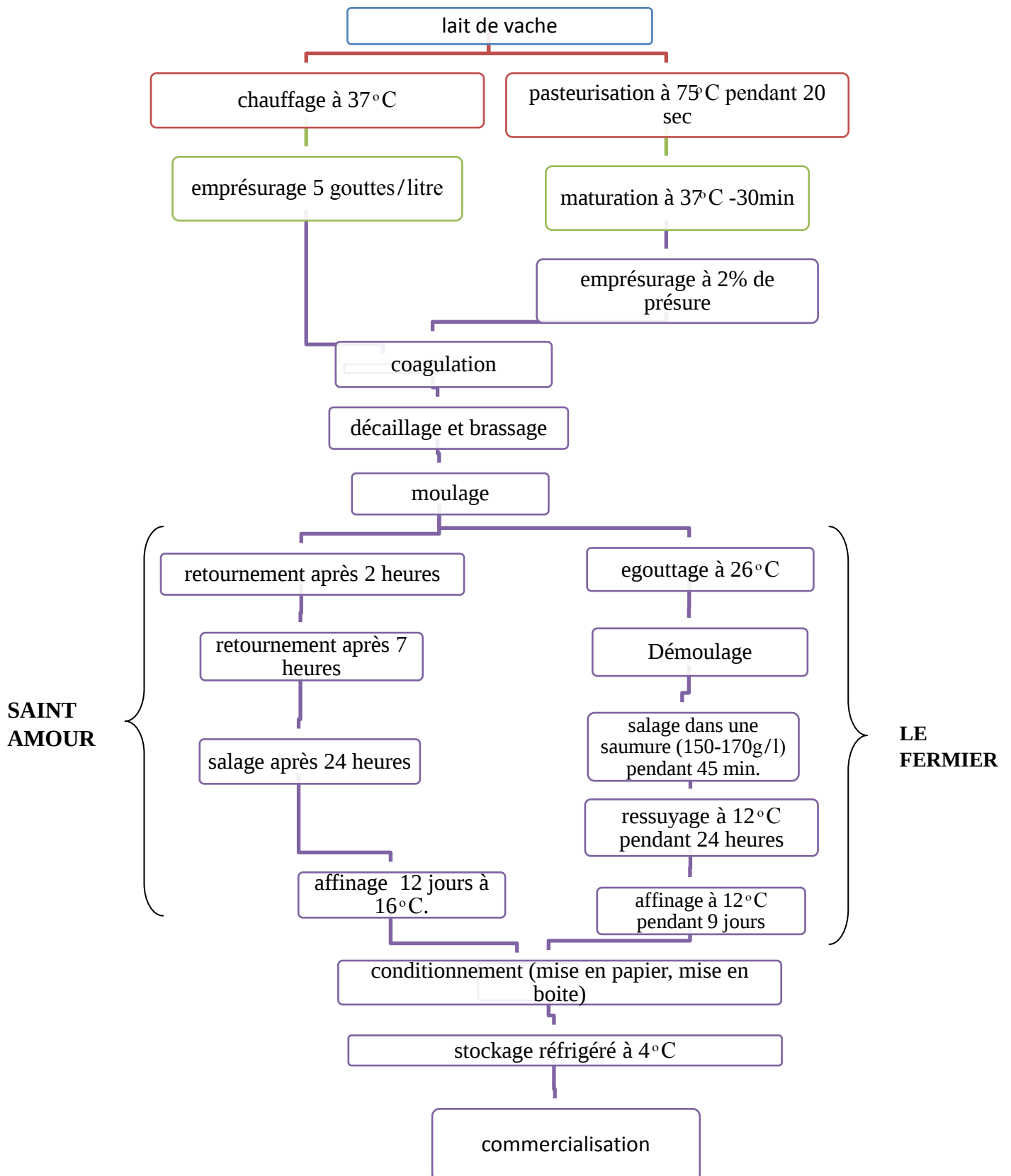


Figure 7 : Diagramme de fabrication du camembert fermier et industriel.

II.3.4. Suivi de la microflore

L'évolution de la flore du camembert durant l'affinage, nécessite le dénombrements des germes aérobie totaux, levures et moisissure, coliformes totaux et fécaux, *Lactobacillus* et streptocoque lactiques et les streptocoques fécaux ainsi la recherche de certains germes pathogènes tels que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. voir tableau suivant :

Tableau VIII : classification des flores microbiennes dénombrés et recherché dans les deux types des fromages.

Flore	Morphologie	Rôles principaux	Pouvoir pathogène	propriétés
<i>Staphylococcus aureus</i>	En amas Cocci En grappe	Aucun rôle technologique Indésirables	Suppuration Production d'entérotoxines, ceci dit troubles gastro-intestinaux (DE CREMOUX et al, 2008). Mammmites subclinique et chroniques chez la vache laitière (LAMPREL, 2003).	Aéro-anaérobies facultatif Se développe à 10%NaCl Température comprise de 10 à 40°C (KLOSS et WOLF SHOHL, 1991 ; TAKAHASHI et al, 1999)
FTAM		Information sur la salubrité générale	Dangereux quand leurs charge est excessive Peuvent contenir des pathogènes	Aérobies, Température comprise entre (20 à 45°C) Incubation pendant 72h à 30°C

Flore lactiques	<i>Lactobacillus bugarius</i>	Bacilles longs parfois incurvés, des fois coccobacilles courts isolés, chainettes Immobile généralement.	Acidification du lait et caillé Participation à la formation du goût (protéolyse, production d'arôme) et la texture (DE ROISSARD et LUQUET, 1994) Activité antipathogènes	Rarement pathogène	Acidophiles avec un ph optimum de 5.5 à 6.2 Intervalle de température de 2 à 53°C Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C
	<i>Streptococcus lactiques</i>	Cellules sphériques ou ovoïdes Disposition en paires ou chainettes longues		Rarement pathogène	Anaérobies aérobie facultatif Incapables de se développer à 15°C
Levures		Procaryotes unicellulaire	Désacidification de la pate au début d'affinage Interviennent aussi dans la formation du goût et de la texture du fromage.		Aérobie Incubation pendant 5 jours à 25°C Tolère une large gamme du ph
Moisissures		pluricellulaires	Agents d'affinage présents à la surface Role determinant dans la formation des caractéristiques sensorielles des fromages	Production du mycotoxines	Tolère une large gamme du ph Aérobie Incubation pendant 5 jours à 25°C

Streptocoques fécaux (groupe D)		chainettes	indicateurs des conditions d'hygiène en production	toxi infections bénignes	Non sporogène Ils résistent mieux que les coliformes et <i>E.coli</i> aux conditions défavorables
coliformes	Totaux	entérobactéries	Gonflement précoces (fromages à patte molle d'aspects spongieux), (MORAL et <i>al</i> , 2004).	L'origine est l'environnement général des vaches	Leur développement est freiné lorsque le ph est inférieur à 4,5 Peut résistants à la chaleur Ils sont détectés à 30°C
	fécaux	entérobactérie	indicateurs des conditions d'hygiène en production	Germes habituels du tube digestif de l'homme et animaux	Ils sont détectés à 44 °C Ne tolère pas les ph bas

II.3.4.1. Préparation de la suspension mère et dilutions décimales

II.3.4.1.1. préparation de la suspension mère

❖ Préparation de la suspension mère pour le lait

Dans le cas d'un liquide la solution mère représente le lait lui-même.

❖ Préparation du la suspension mère dans le cas du fromage

Dans des conditions d'asepsie et avec un matériel stérilisé (couteau, pince.....), on prélève 10g du camembert additionné de 90ml de l'eau physiologique dans un flacon, agiter la suspension obtenue pour bien homogénéiser, l'eau physiologique a pour but de garder la survie des microorganismes ainsi d'empêcher leur multiplication. La préparation obtenue représente la dilution 10^{-1} .

II.3.4.1.2. Préparation des déluions décimales

❖ Dans le cas du lait

A partir de chaque suspension mère préparée, on doit réaliser des dilutions Pour chaque suspension mère, on prépare le nombre de tube selon celui de dilutions qu'on veut

obtenir, chacun doit contenir 9ml d'eau physiologique. Toujours dans les conditions d'asepsie on transfère 1ml de la suspension mère vers le premier tube à la fin on obtient la dilution 10^{-2} . Ensuite on prélève 1 ml du premier tube après agitation qu'on verse dans le deuxième tube comme ça on aura la dilution 10^{-3} .

❖ **Dans le cas du fromage**

De la même façon on réalise les dilutions en réduisant le nombre de dilutions par rapport au fromage généralement jusqu'à 10^{-7} dans le cas du fromage (Annexe 1).

Afin de dénombrer les bactéries à partir des différentes dilutions, on utilise la formule suivante :

$$N = \frac{N1 + N2}{(n1 + 0.1 \times n2) \times d}$$

N : nombre de bactéries UFC/g

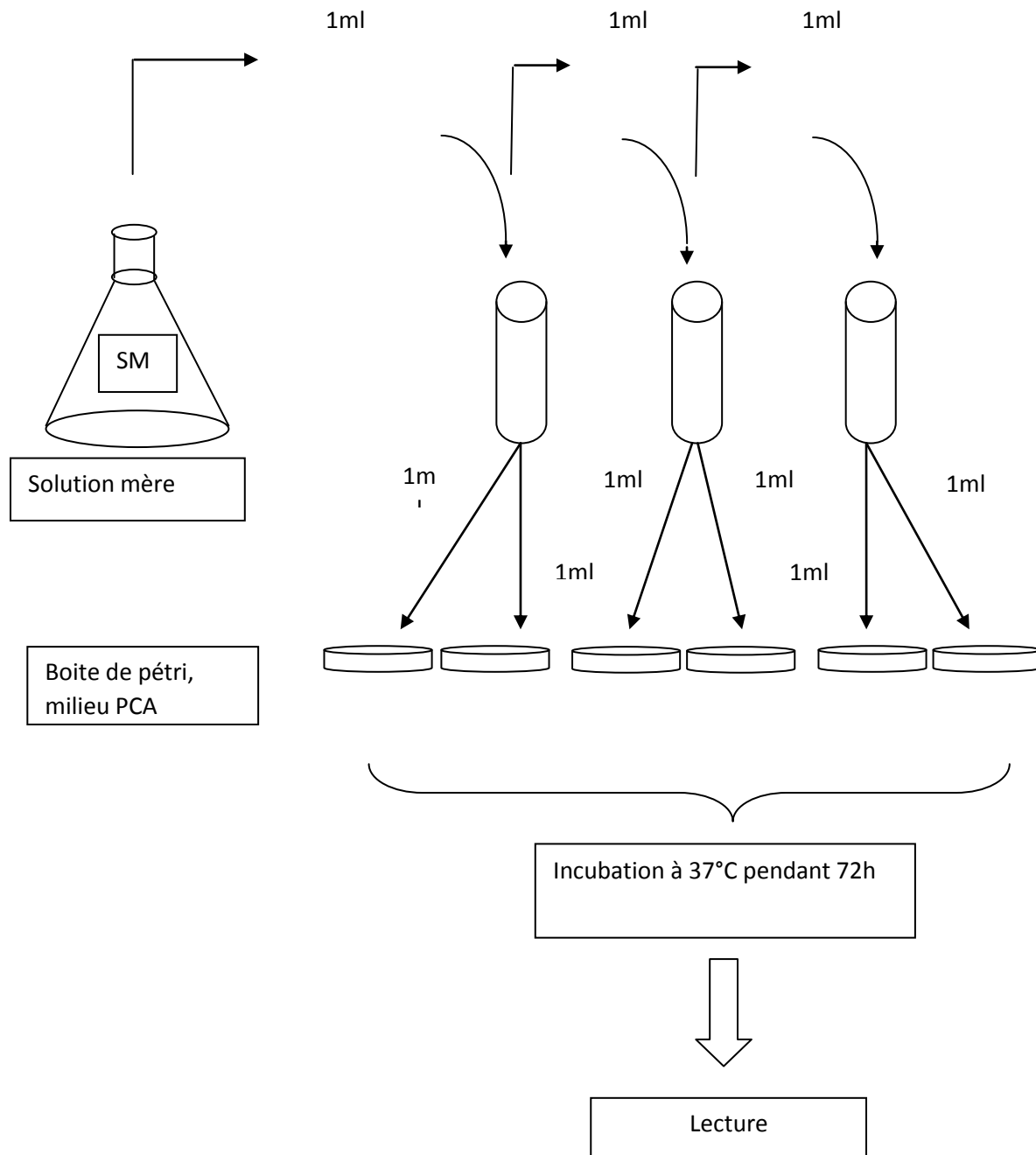
N1 : nombre de colonies de la 1^{ère} dilution

N2 : nombre de colonies de la 2^{ème} dilution

n1 : nombre de boîtes pris en considération dans la 1^{ère} dilution

n2 : nombre de boîtes pris en considération dans la 2^{ème} dilution

d : inverse de la dilution

II.3.4.2.Dénombrement des principales flores**II.3.4.2.1.Les germes aérobies totaux (GAT) dans le lait et le camembert (voir annexe 2).****Figure 8** : recherche et dénombrement des FTAM sur milieu PCA dans le lait

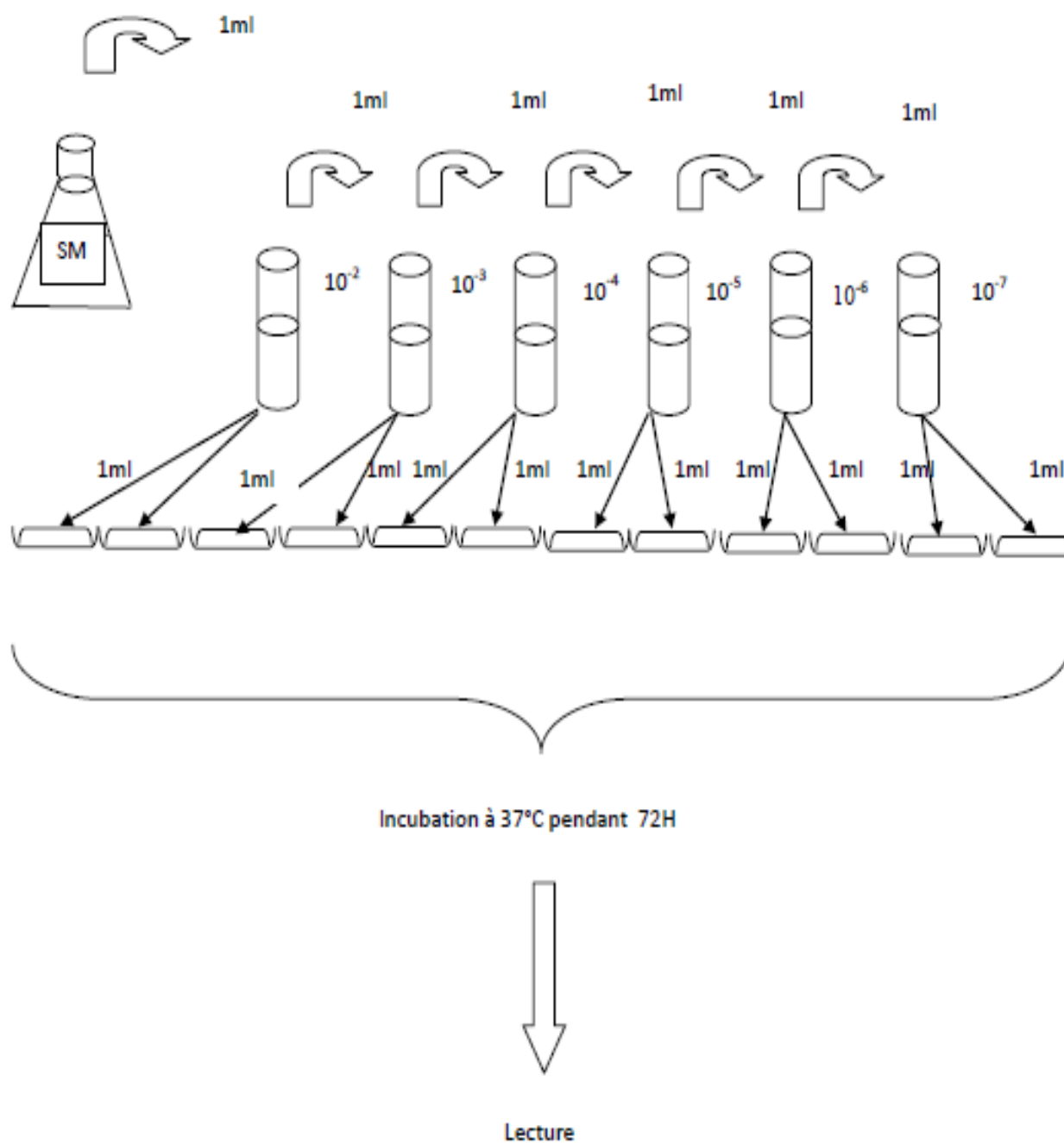


Figure 9 : dénombrement de la flore mésophile totale dans le fromage

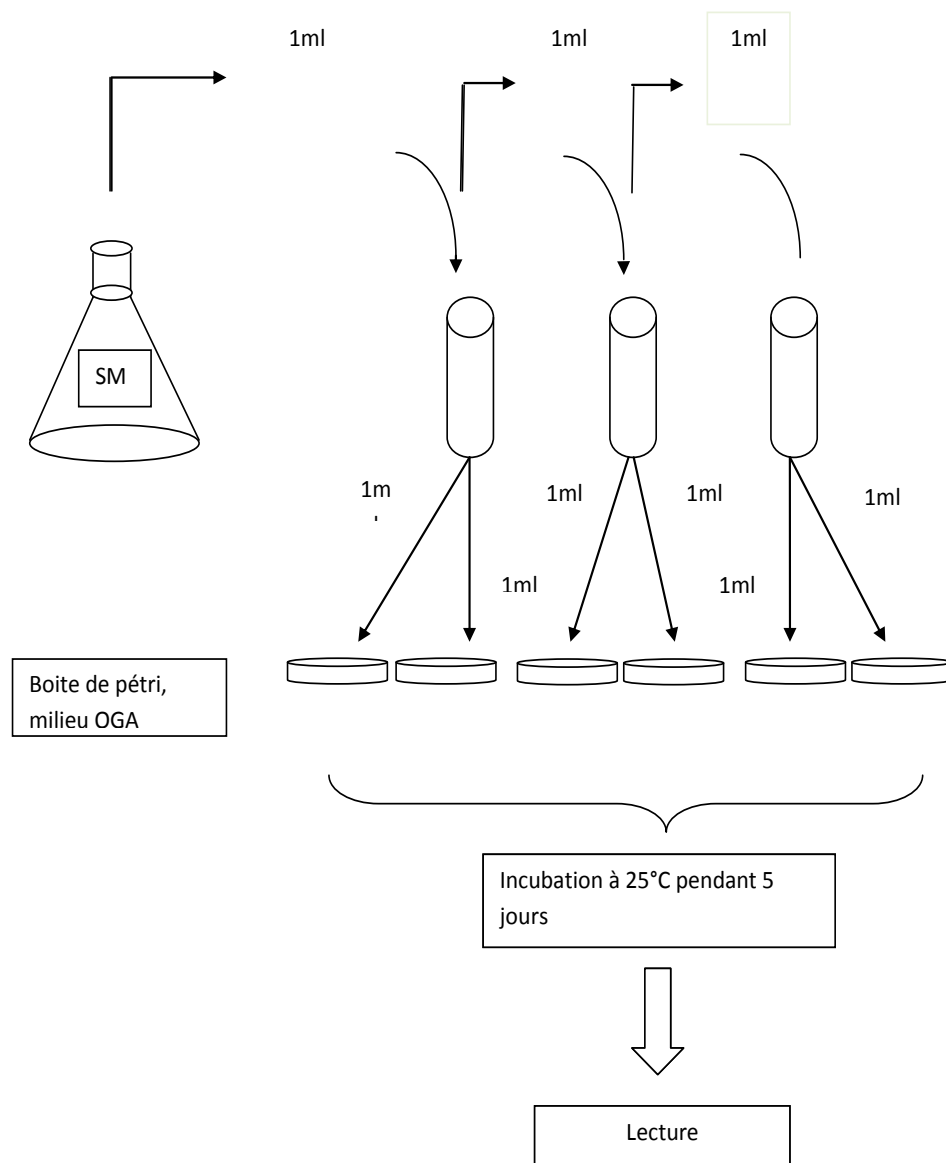
II.3.4.2.2. Dénombrement des levures et moisissures (lait et fromages) (Annexe 3).

Figure 10 : recherche et dénombrement des levures et moisissures sur milieu OGA dans le lait.

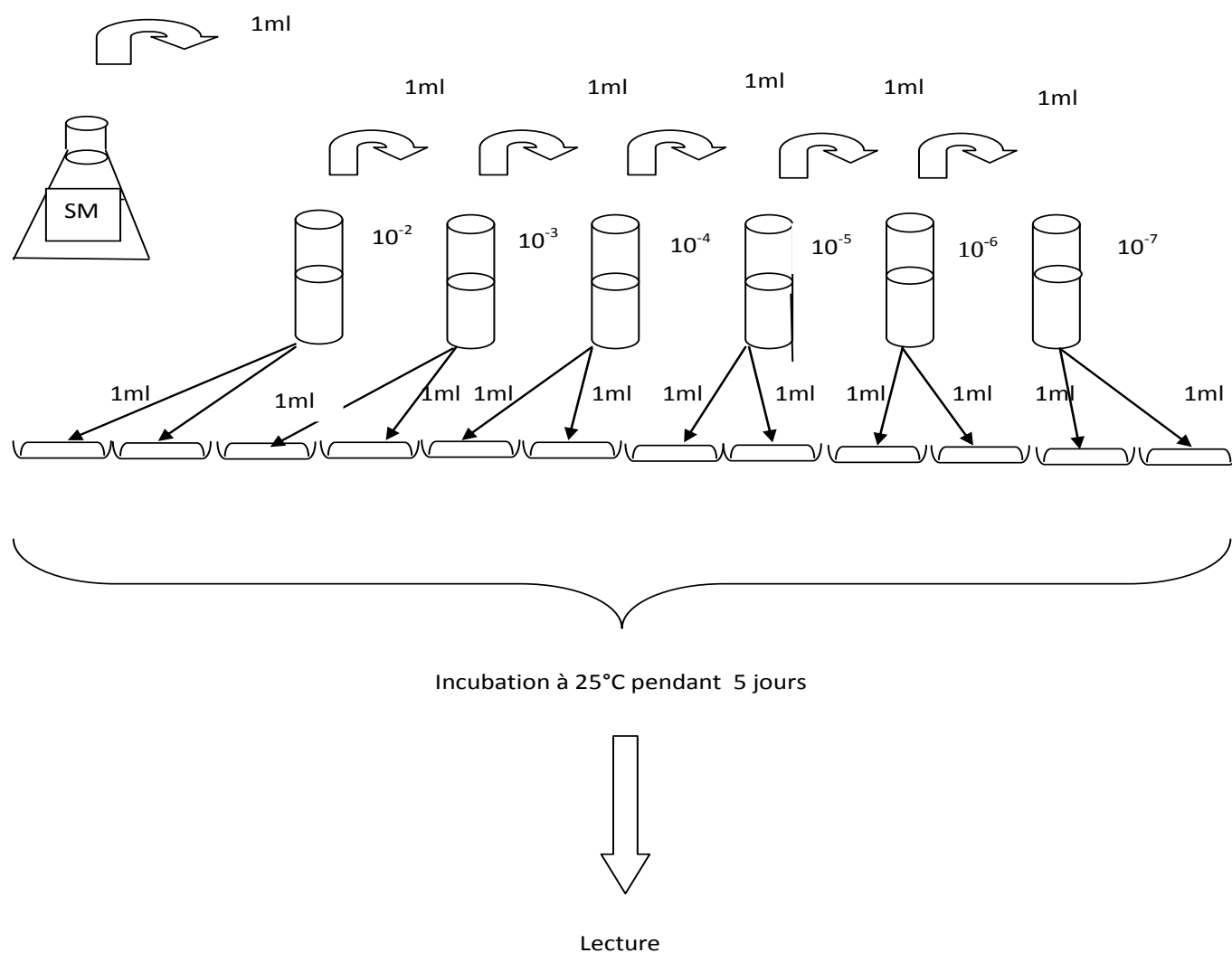
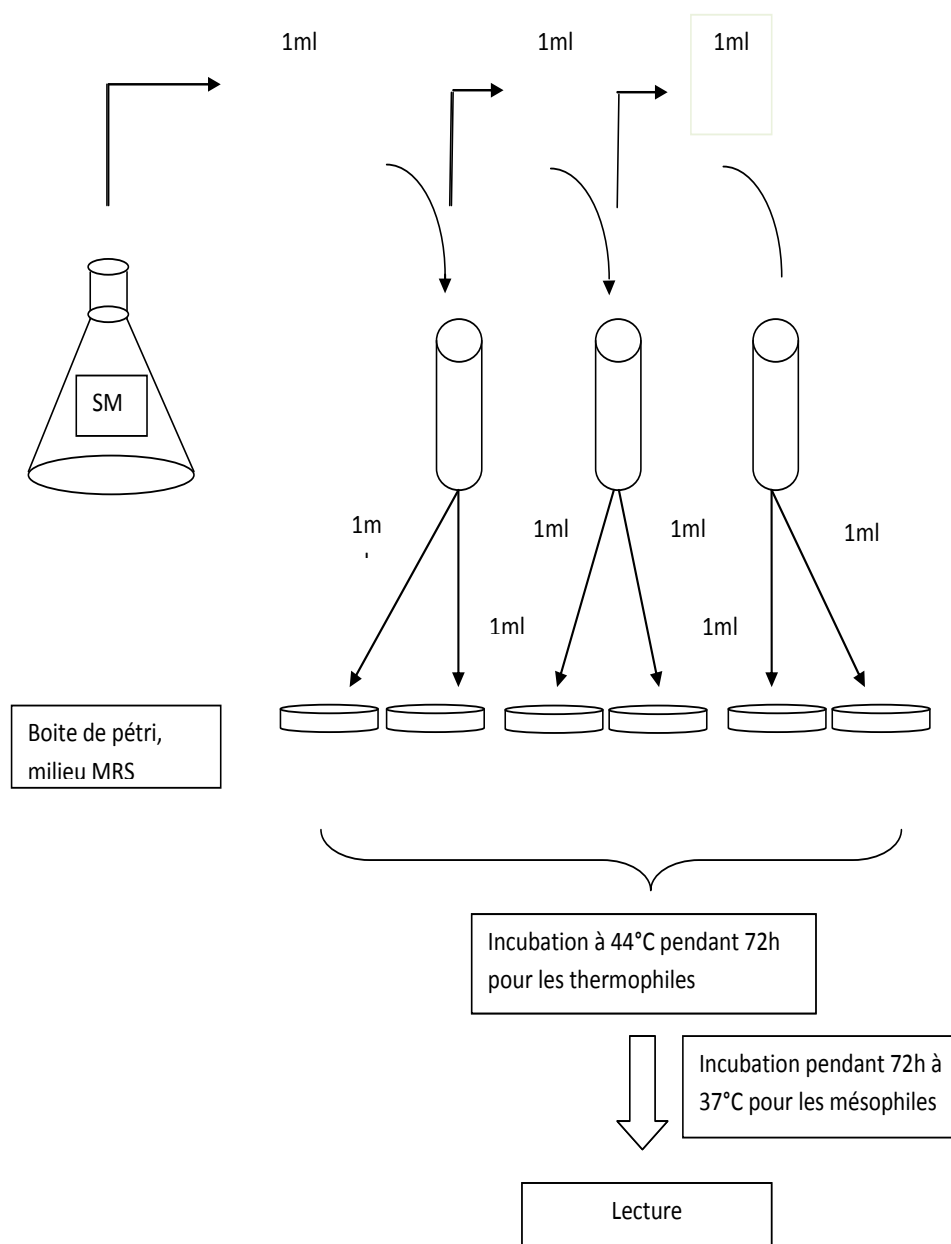


Figure 11 : dénombrement des levures et moisissures sur milieu OGA dans le fromage.

II.3.4.2.2. Dénombrement des lactobacilles lactiques (lait et fromages) (Annexe 4).**Figure 12 :** recherche et dénombrement des lactobacilles dans le lait.

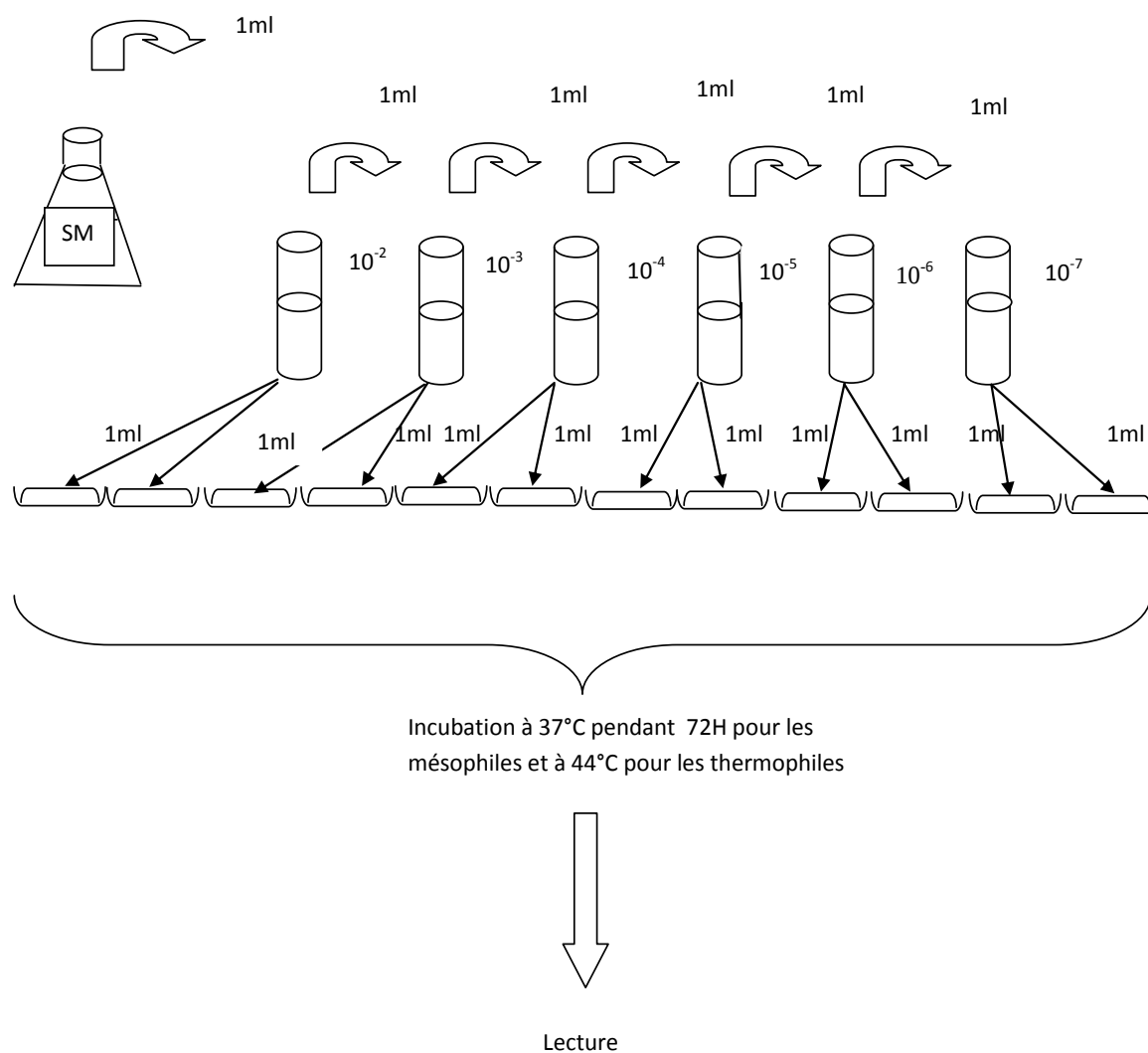
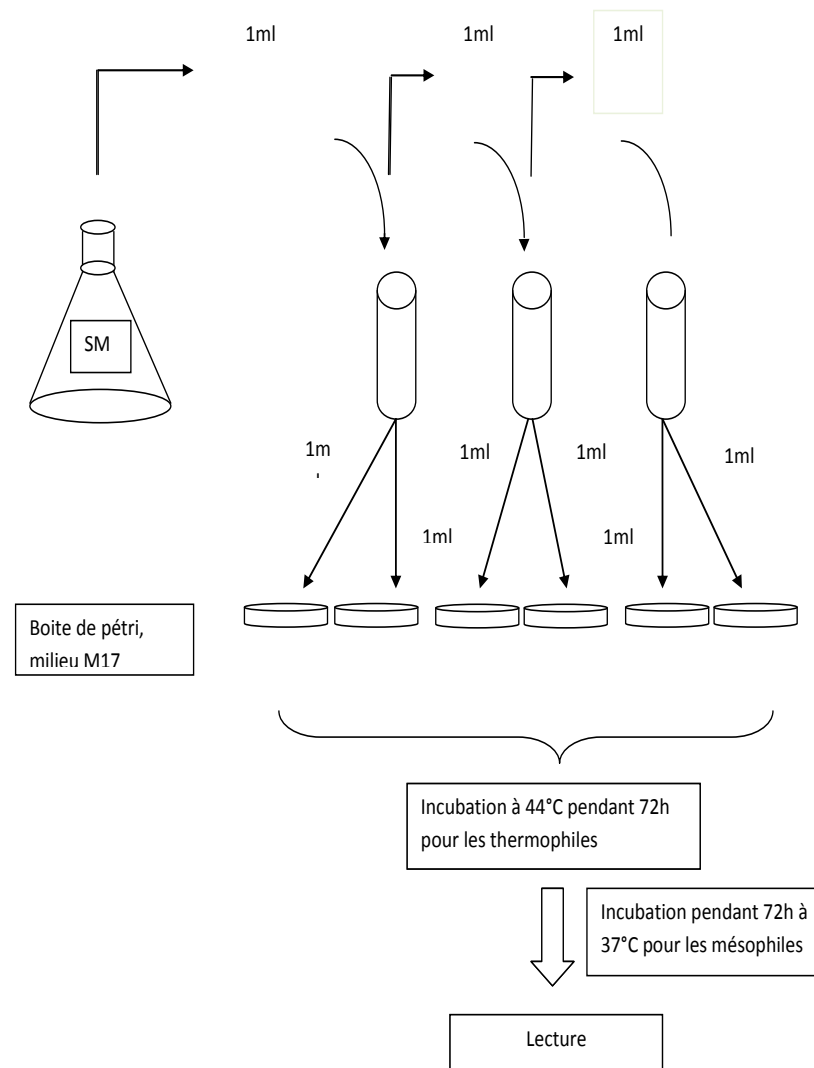
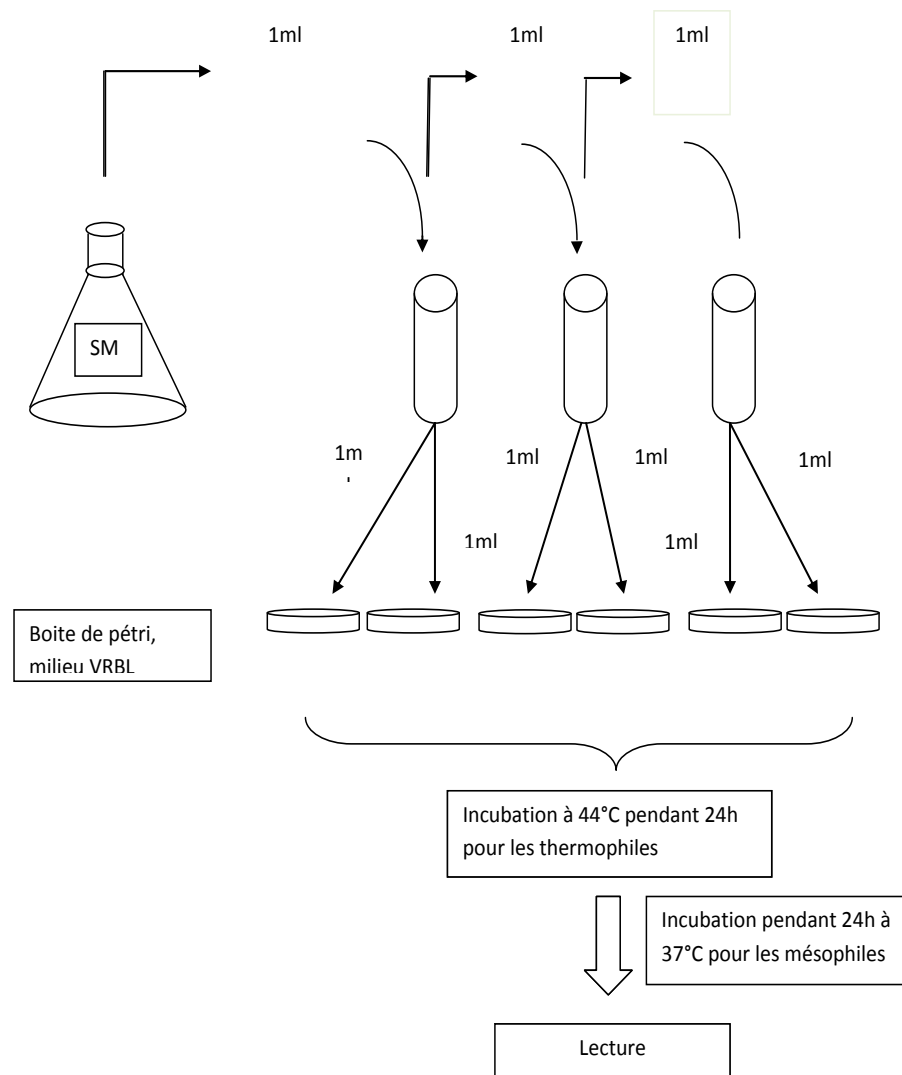


Figure 13 : dénombrement des lactobacilles dans le fromage sur milieu MRS.

II.3.4.2.3. Dénombrement des streptococcus lactiques (lait et fromages)**Figure 14 :** recherche et dénombrement des streptococcus dans le lait.



II.3.4.2.4. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (Annexe 5,6).**Figure 16** : recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans le lait.

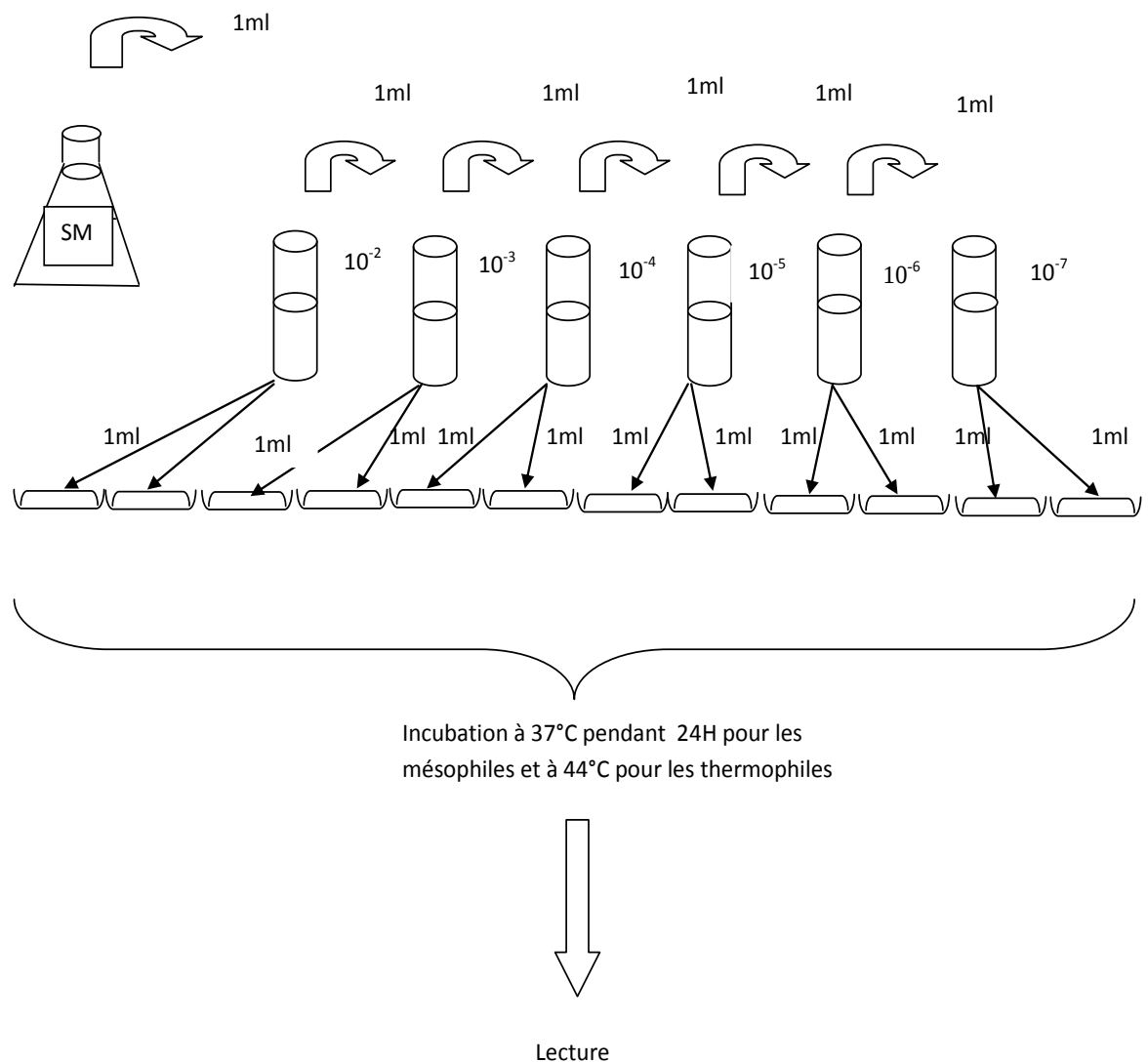


Figure 17 : dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans le fromage sur milieu VRBL.

II.3.4.3. Recherche des *Staphylococcus aureus*

La présence de *Staphylococcus aureus* dans une denrée alimentaire est un indice de contamination humaine qui introduit la dégradation de la qualité sanitaire du produit (GUIRAUD, 2003). Ces germes appartiennent au micrococcaceae, ce sont des cocci à gram+, non sporulé et immobiles se sont des germes aéro-anaérobie facultatif (Annexe 7).

A fin de recherché ce germe on a intérêt à suivre les étapes suivante :

- **L'enrichissement** : Le but de cette étape est de faire revivifier les germes et on procède comme suit :

Introduire 1ml du lait ou bien de la suspension mer dans le cas du camembert dans 15ml de GC, après homogénéisation par une simple agitation on incube à 37°C pendant 24 heures. Les tubes ayant une modification de la couleur vire au noir sont considérées comme positif.

- **L'isolement** : Ce fait juste pour les tubes positifs et on procède comme suit :

En premier lieu on doit coulée la gélose cette fois ci on utilise la gélose Chapman comme milieu de culture sur les boites de pétri. Just après ce fait l'ensemencement sur la gélose solidifié. L'incubation ce fait à 37°C pendant 24 à 48 heures (Voir figure 18).

- **L'identification** : Les colonies de *Staphylococcus aureus* ont une taille moyenne, lisses, brillantes et ont une couleur jaune.

Afin de les identifier on fait deux tests :

- **Test de catalase**

On prélève une colonie suspecte, on la dépose sur une lame en verre propre en plus quelques gouttes d'H₂O₂ (Annexe 8).

Une effervescence avec un dégagement de gaz témoigne la présence de la catalase (voir figure 20).

- **Test de la coagulase**

On prélève les colonies suspectées d'être *Staphylococcus aureus*, on les introduit dans un tube contenant un bouillon nutritif, puis on incube à 37°C pendant 24 heures.

Juste après la fin de la duré d'incubation on prend 0,5ml de milieu d'enrichissement + 0,5ml de plasma du lapin encore une fois le tout est incubées à 37°C pendant 24 heures (Annexe 9).

La coagulation du plasma nous confirme qu'il s'agit de germe recherché (voir figure 19).

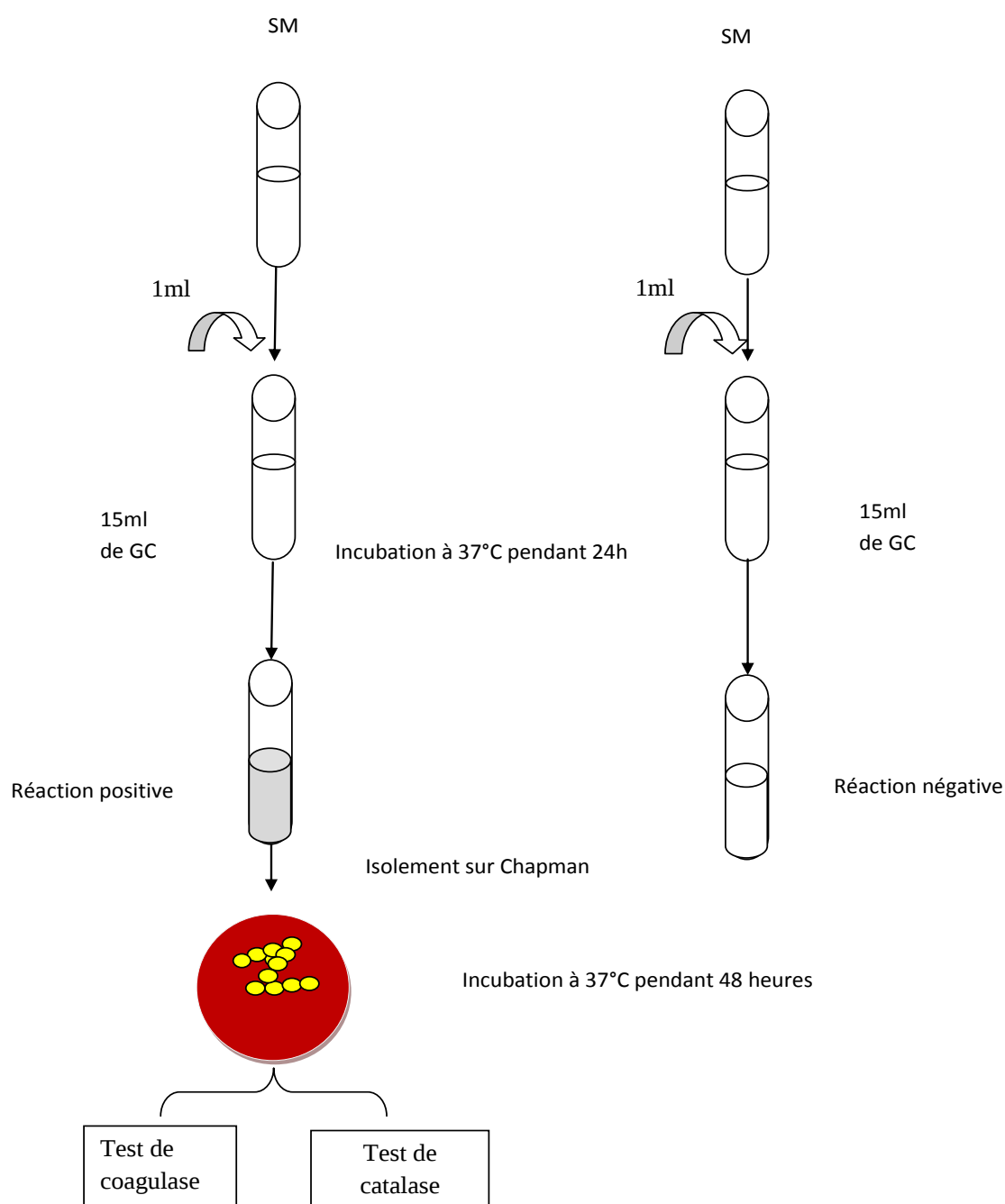


Figure 18 : recherche de *staphylococcus aureus*.

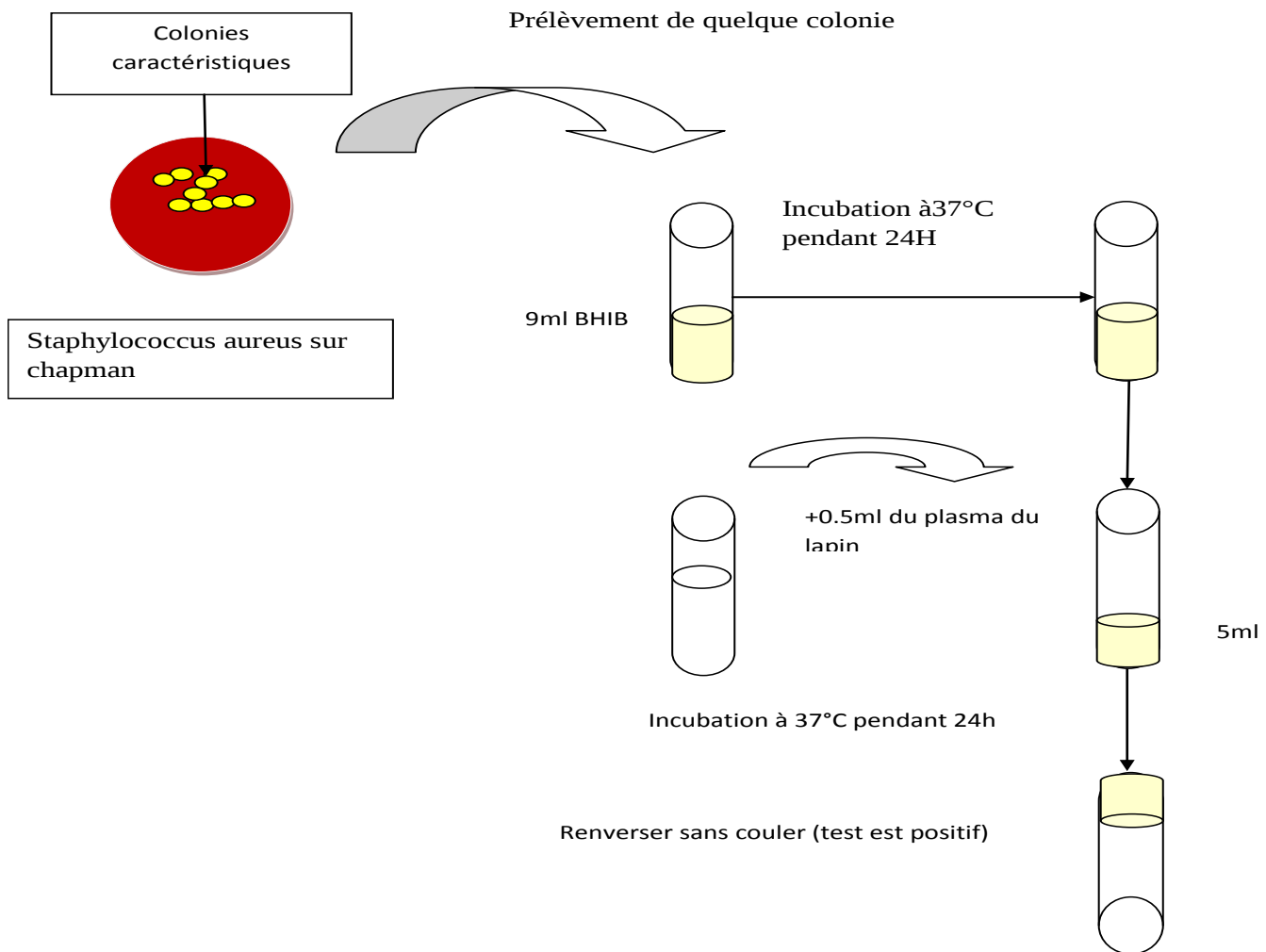


Figure 19 : Test coagulase.

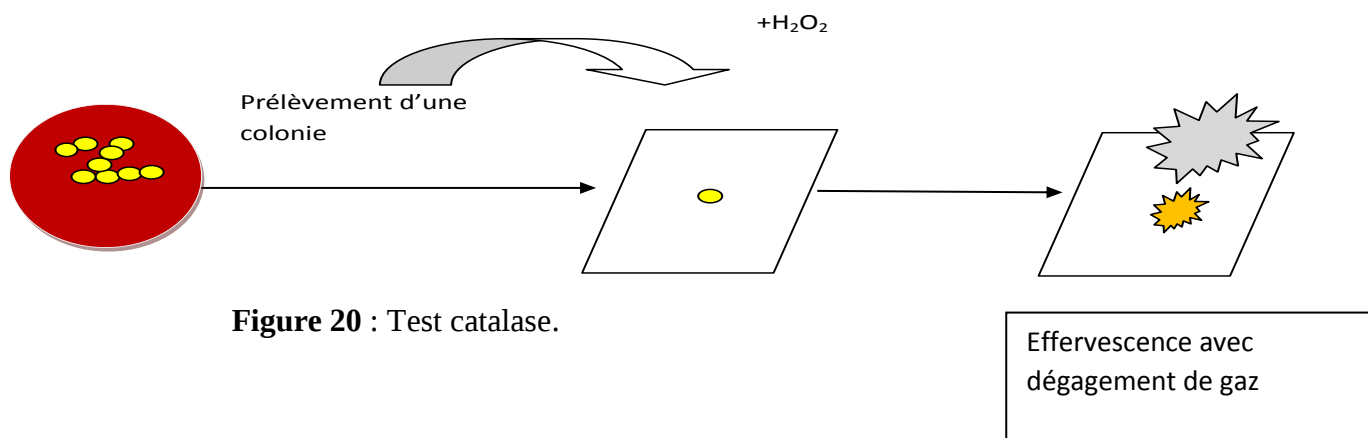


Figure 20 : Test catalase.

II.3.5. Analyse physicochimique

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont le pH, la densité, le point de congélation, EST extrait sec total, ESD extrait sec dégraissé, MG et l'acidité (AMIOT *et al*, 2002).

II.3.5.1. Le pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Avant chaque mesure, l'électrode du pH-mètre est nettoyée avec de l'eau de robinet, puis rincée à l'eau distillée et séchée avec du papier buvard. Un contrôle sur la fiabilité du pH-mètre est effectué avant chaque mesure, par étalonnage de l'appareil à l'aide de deux solutions tampons de pH connus (4,00 et 7,00). Ensuite la mesure est faite par immersion du bout de l'électrode dans le lait. La valeur du pH s'affiche immédiatement sur l'écran. Avant d'entreprendre une autre mesure, l'électrode est à nouveau nettoyée, puis rincée comme précédemment.

La procédure de mesure du pH du fromage est identique à celle du lait, avec l'immersion de l'électrode au cours du produit.

II.3.5.2. Détermination de la densité

La densité nous renseigne sur le taux de matières solides et sur la viscosité de la solution. La densité du lait dépend de tous ses constituants. Elle varie avec le taux butyreux et la teneur en matière sèche dégraissée. Diminuant lorsque le taux butyreux augmente et augmentant en même temps que la teneur en matière séchée dégraissée. La densité permet de soupçonner un mouillage ou un écrémage du lait puisque celui-ci l'augmente et l'addition d'eau a un effet inverse. (MATHIEU, 1998). Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C.

La densité est déterminée à l'aide d'un thermolactodensimètre étalonné de manière à donner par simple lecture du trait correspondant au point d'effleurement la densité du lait analysé dans lequel il flotte (annexe 10).

II.3.5.3. L'acidité de titration ou acidité Dornic

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18°Dornic (°D). Conservé à la température ambiante, il s'acidifie spontanément et progressivement (MATHIEU, 1998). C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes (CIPC lait, 2011).

Cette acidité consiste à la titration du lait ou la solution fromagère en présence d'un indicateur coloré phénolphthaléine par solution du NaOH (annexe 11).

II.3.5.4.Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode de GERBER (1974).

Le principe de cette méthode est basé sur la dissolution du produit à doser (excepté la matière grasse) par l'acide sulfurique. Sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction d'une faible quantité d'alcool isoamylique, la matière grasse se sépare en couche claire dont les graduations du butyromètre révèlent le taux (le mode opératoire est donné en annexe 12).

II.3.5.5.Détermination de l'extrait sec total (EST)

L'extrait sec total est déterminé à l'aide d'un dessiccateur infrarouge. Le principe consiste à sécher l'échantillon par l'émission de radiations infrarouges et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance intégrée. Le pourcentage d'humidité ou de solide est calculé par la différence entre le poids humide initial et le poids sec final. Dans le cas du lait le poids initial est 3g et dans le cas du fromage est de 5g (Voir annexe 13).

L'extrait sec dégraissé (ESD) est déterminé en faisant la différence entre l'extrait sec total (EST) et la matière grasse (MG).

$$\text{ESD (g/100g)} = \text{EST (g/100g)} - \text{MG (g/100g)}$$

II.3.5.6.Test d'antibiotique

Ce test s'effectue juste à l'arrivée du lait dans l'usine, il consiste à révéler toute trace d'antibiotique présente dans le lait (annexe 14).

II.3.5.7.Dosage des protéines par la méthode de Bradford et al, (1976)

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration des protéines en solution.

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexification) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

Une courbe d'étalonnage a été tracée par l'utilisation de l'albumine sérique bovine (BSA) commerciale qui a servi comme protéine étalon, la valeur de la densité optique donnée par le spectrophotomètre permet par projection sur la courbe d'étalonnage de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon utilisé (annexe 15).

II.3.6. Etude de l'activité antimicrobienne

II.3.6.1. principe

Tester le potentiel antibactérien du camembert vis-à-vis des deux souches pathogènes « *E. coli* » et « *Staphylococcus aureus* » à partir du surnageant de la solution fromagères soumis à une centrifugation.

On a procédé à :

L'élimination de l'effet de l'acidité par la neutralisation du pH et l'élimination de l'effet de peroxyde de l'hydrogène (H_2O_2) par la création de conditions d'anaérobiose et cela permet le cœur de fromage.

II.3.6.2. Technique

Pour la mise en évidence de la production de substances antibactériennes par la fromage, on a choisi deux techniques l'une sur milieu gélosé (méthode des disques et la méthode des puits) la production de substances antibactériennes se manifeste par l'apparition de zone d'inhibition autour des disques et des puits, et l'autre sur milieu liquide basé sur le calcul de la densité optique à une longueur d'onde bien définit.

La méthodologie adopté est celle de DUPAS et *al*, (2005) optimiser selon les besoins et les moyens.

❖ Préparation de l'extrait soluble de fromage

Préparer la solution mère en mélangeant 20g de fromage (1er et dernier jour d'affinage) avec 40ml d'eau physiologique, puis centrifugé à 3500 g pendant 30min, on récupère ainsi le surnageant contenant des substances antibactérienne à l'état brute (pH=5.4).

❖ Préparation de l'extrait soluble neutralisé

On devise le surnageant obtenue en deux volumes égaux, l'un à l'état brut et l'autre neutralisé avec une base NaOH (pH=7).

❖ Préparation des inocula

Les souches cibles *E.coli* et *S.aureus* appartenant au laboratoire de microbiologie de l'Université de Mouloud Mammeri ont été revivifié dans 9 ml du bouillon BHIB durant 24h à 37 °C, ensuite en effectue un isolement en strie sur gélose PCA, puis incubé à 37°C pendant 24h, à partir de cette gélose en gratte quelque souches dans 9ml de l'eau physiologique pour préparé les inocula.

Chaque inoculum est standardisé par l'ajout d'eau physiologique ou de colonies afin d'avoir une densité optique entre 0.08-0.1 qui correspond à une charge microbienne égale à 10^6 UFC/ml pour une longueur d'onde de 625nm.

II.3.6.2.1.Détermination de l'activité antibactérienne en milieu gélosé

❖ Méthodes des puits

En premier lieu on introduit 1ml de l'inoculum standardisé dans 9ml de gélose MH liquifié, ce mélange est coulé sur boîte de pétri, après solidification puits ont été creusés dans le milieu, à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

Le premier puits a été rempli le surnageant brute B, le deuxième avec surnageant neutralisé N, et le troisième avec le témoin T qui est le BHIB.

Les deux boîtes sont étiquetées et mises au réfrigérateur 1heure pour une bonne diffusion est incubés à 37°C pendant 24h.

❖ Méthode des disques

Le milieu MH est préalablementensemencé à l'aide des écouvillons stériles introduit dans les inocula standardisé des souches standardisés. Pour obtenir un ensemencement homogène l'écouvillon 2 à 3 fois sur la surface de la gélose. Juste après on dépose 3 disques préalablement imbibé dans le brute (B), neutralisé(N) et le témoin (T).

Les deux boîtes sont étiquetées et mises au réfrigérateur 1heure pour une bonne diffusion est incubés à 37°C pendant 24h.

L'apparition des halos clairs au tour des disques correspond aux zones d'inhibition.

II.3.6.2.2.Détermination de l'activité antibactérienne en milieu liquide

On prépare 03 séries du tube à essai stérile,

La première série doit contenir 9ml de BHIB, puis on lui ajoute 1 ml de l'inoculum standardisé contenant la souche standardisé, ce qui constitue les tubes témoins.

La deuxième série doit contenir 5 ml de BHIB, puis on lui ajoute 1 ml de l'inoculum standardisé contenant la souche cibles et 4 ml du surnageant brute, ce qui constitue les tubes brutes.

La troisième série doit contenir 5ml de BHIB, puis on lui ajoute 1ml de l'inoculum standardisé de la souche cible et 4 ml du surnagent neutralisé PH=7, ce qui constitue les tubes neutres.

La densité optique des cultures obtenues est mesurée avant et après 24 heures.

La présence de l'activité antibactérienne se traduit par la diminution de la densité optique après 24 heures.

II.3.7. Activité anti-oxydante

II.3.7.1. Activité anti-radicalaire

Pour la recherche de l'activité anti radicalaire on a utilisé la méthode décrite par OYAIKU (1986). qui consiste à utiliser le test de piégeage du radical libre DPPH.

50µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0,0125 à 5mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) (Annexe 16).

$$I\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$$

II.3.7.2. Pouvoir chélateur

Test de la réduction du fer FRAP : Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par OYAIKU (1986).

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,007 à 2,5mg/ml) est mélangé avec 1ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%.

L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 1ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (1ml) de surnageant est combinée avec 1ml d'eau distillée et 0,2ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1%. Après 10 min d'incubation à l'obscurité. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Annexe 17).

Références Bibliographiques



-III. Résultats physicochimiques

III.1. Résultats physicochimiques du lait

Les résultats des analyses physicochimiques des laits utilisés dans la production des différents lots du camembert artisanal et industriel sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XI: Valeur moyenne des analyses physicochimiques du lait utilisé en fabrication fromagère.

	Lait cru (fermier)	Lait de mélange pasteurisé (industriel)	Normes FIL-AFNOR (1980)
PH à 20°C	6.4 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1	6.6-6.8
Acidité D°	16 $\pm$ 0.57	15.5 $\pm$ 0.49	16-18
EST (g/100g)	124.4 $\pm$ 3.27	108.1 $\pm$ 2.23	102-125
ESD (g/100g)	82.7 $\pm$ 6.26	79.1 $\pm$ 5.20	87.5-89.9
Protéine%	32.6 $\pm$ 0.57	26.76 $\pm$ 0.45	34.36
Matière grasse%	31.9 $\pm$ 3.05	29 $\pm$ 2.01	34-36
Densité	1.029 $\pm$ 0.001	1.027 $\pm$ 0.002	1.028-1.032

EST : extrait sec totale ; ESD : extrait sec dégraissé.

✓ L'acidité

Les valeurs moyennes obtenues que ce soit pour le lait cru ou le lait de mélange sont des valeurs rependantes à la limite d'acceptation par l'AFNOR.

Toute argumentation de celle-ci traduit une mauvaise conservation ou un mauvais transport du lait. L'acidité indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18°Dornic (°D). Conservé à la température ambiante, il s'acidifie spontanément et progressivement. C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes (MATHIEU, 1998).

✓ EST

La mesure de l'extrait sec a révélé une moyenne de 124.4g/l pour le lait cru et 108.1 pour le lait de mélange, ces deux valeurs sont conformes à la norme qui est de 102-125g/l. Celle-ci semble plus faible par rapport à celle du lait (128 g/l selon ALAIS, 1984) et humain (129 g/l) (SIBOUKEUR, 2007).

Cette teneur varie également en fonction du stade de lactation (BENGOUNI *et al*, 1994). Ainsi, elle diminue durant le mois suivant le vêlage, puis augmente suite à l'accroissement des taux de matière grasse et azotée (ANONYME 3, 1995).

✓ Protéine

Les valeurs moyennes obtenues pour le lait cru et le lait de mélange sont respectivement 32.6 et 26.76g/l, ces valeurs sont faibles par rapport à la norme qui est de 34-36g /l, ceci peut être expliqué par le fait que la teneur en protéine d'un lait est sujette a plusieurs facteurs dont l'alimentation, la race, la saison et le stade de lactation.

La teneur protéique, varie en fonction des stades de lactation. Selon KAMOUN (1995), les deux premiers mois de lactation se caractérisent par une diminution des taux, protéinique et butyreux du lait. Ces derniers atteignent une valeur minimale coïncidant avec le pic de lactation, puis retrouvent, en fin de lactation, un niveau comparable à celui de départ.

✓ Matière grasse

La teneur en matière grasse du lait cru et de mélange sont respectivement de 31.9 et 29 g/l qui sont inférieure par rapport à la norme établie par l'AFNOR. A noter que la matière grasse elle aussi dépend de plusieurs facteurs telle que l'alimentation la race et le stade de lactation.

Selon (HODEN et COULON, 1991) la matière grasse est variable d'un jour à l'autre, car elle est fortement liée à la traite, elle est l'élément le plus fortement et rapidement modifiable par l'alimentation.

✓ Densité

Les valeurs moyennes obtenues pour le lait cru et lait de mélange sont respectivement de 1.029 et de 1.027, le lait cru concorde avec la norme qui est du 1.028-1.032, hors que le lait de mélange présente une densité un peu faible par rapport a cette norme cette différence est liées à leurs teneur en EST comme trouvé auparavant le lait cru était plus riche en EST par rapport au lait de mélange.

Ce paramètre est très utile en industrie car il permet la détection des fraudes comme le mouillage qui abaisse la teneur du lait en ses divers constituants.

III.2.Moyenne des résultats d'analyses physico-chimiques du camembert artisanal « Saint Amour » et industriel « Fermier » an cours d'affinage

Les différents analyses physicochimique ont été effectué sur deux types de camembert artisanal « Saint amour » et industriel « Fermier », en suivant 03 productions différentes pour chacun tout au long de l'affinage. Les fromages analysés étaient de bonne qualité, sans défaut sensorielles et du gout agréable.

Les différentes moyennes des résultats physicochimiques obtenus sont portées dans le tableau qui suit :

Tableau X : moyennes des résultats physicochimiques du fromage

	Production 1, 2, 3			Production 1, 2, 3		
	Fermier			Saint amour		
	1j	5j	9j	1j	6j	12j
Ph à 20°C	5.38±0.04	5.2±0.11	5.55±0.07	5±0.1	4.82±0.32	4.92±0.1
Acidité(%)	1.81 ±0.04	3.62±0.06	1.56±0.07	3.08±0.1	4.69±0.13	2.72±0.15
Matière grasse(%)	24.22±2.64	26.22±1.73	26.50±1.73	18±0.89	20±1	24±0.45
EST (g/100g)	45.63±0.98	47.35±0.66	49.64±1.82	42.42±0.73	46.77±0.44	53.77±0.63
ESD (g/100g)	19.41±1.86	20.85±1.13	25.42±0.36	24.42±0.33	26.77±0.61	29.77±0.36
Protéine(%)	11.48±2.64	12.3±1.73	13.05±1.73	12.17±0.2	13.4±0.32	14.75±0.1

✓ Variation de l'EST, ESD, MG et protéines

Les teneurs en EST, ESD, MG et les protéines augmentent au cours de l'affinage que se soit pour le camembert fermier ou industriel, ceci s'explique par la concentration des constituants de la matière sèche essentiellement la MG et les protéines au cours de l'affinage.

L'analyse statistique de l'EST et l'ESD dans le fromage « saint amour » montre qu'il ya une différence hautement significative de ces deux paramètres entre les différents stades d'affinage étudié avec p-value de 0.0002, 0.0003, 0.0007 voir annexe (19), cette même analyse pour la MG et les protéines montre une différence significative entres les différents jours d'affinages étudiés avec p-value de 0.035, 0.002, 0.002 voir annexe (20, 21, 22).

Une analyse statistique comparatives entre le camembert « saint amour » et « Fermier » montre qu'il est une différence significative pour la MG au niveau du 5^{ème} jour d'affinage pour le même paramètre voir annexe (23), et encore dans le cas des protéines et l'ESD au niveau de 5^{ème} et 9^{ème} jour d'affinage voir annexe (24, 25)

✓ Variation du ph et l'acidité

Le ph et l'acidité évoluent inversement au cours de l'affinage, le ph diminue légèrement au 5^{ème}j d'affinage juste âpres en remarque une augmentation de celui-ci jusqu'au dernier jour d'affinage et inversement pour l'acidité qui connais une augmentation au 5^{ème}j d'affinage et une diminution jusqu'au dernier jour. Ceci est valable dans le cas du camembert artisanal.

L'analyse statistique comparative de ces deux paramètres entre les deux types des fromages « fermier » et « saint amour » au long de l'affinage montre qu'il existe une différence significative au dernier jour d'affinage avec p-value =de 0.012 et 0.017.

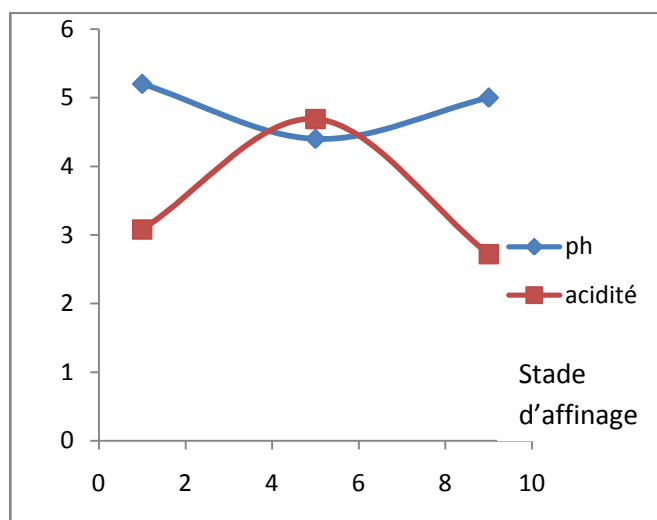


Figure21 : évolution du ph et l'acidité du fromage artisanal « Saint amour » aux différents stades d'affinage.

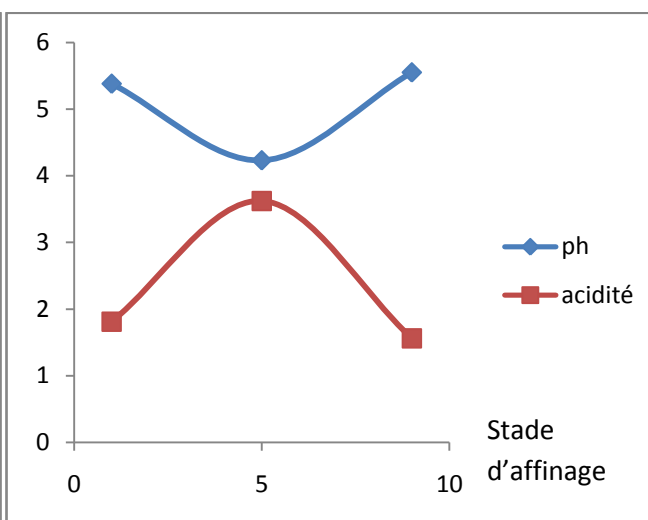


Figure22 : évolution du ph et l'acidité du fromage industriel « Fermier » aux différents stades d'affinage.

III.3. Evolution de la microflore au cours de l'affinage

Notre étude a porté sur le suivi de la microflore de 3 échantillons appartenant à 3 lots différents de production différente de deux types de fromage à pâte mole, industriel « Fermier » et artisanal « Saint amour ». La collecte des échantillons a été réalisée dans des conditions d'aseptie.

Pour les deux types du camembert on a procédé dans un premier temps à une numération des groupes microbiens suivants : flore mésophiles aérobie totale, bactéries lactiques, coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux, levures et moisissures. Une recherche a été effectuée pour les deux bactéries pathogènes suivantes : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Dans un second temps, on a mis en évidence l'activité antimicrobienne des deux types du camembert au cours de l'affinage, ou on a testé deux souches de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*).

Dans un dernier temps, on a soumis nos résultats à une analyse statistique comparative pour le même produit aux différents stades d'affinage et entre les deux produits aux différents jours d'affinage.

III.3.1. Résultats microbiologique du lait

Les résultats d'analyses obtenues pour la numération et la recherche des différents groupes microbiens dans les laits utilisés en fromageries, le lait cru pour la fabrication

fromagère artisanale et le lait cru de mélange utilisé dans la fabrication fromagère dans l'industrie sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XI : résultats de l'analyse microbiologique du lait

Production 1, 2, 3		Lait cru de mélange pasteurisé	Lait cru
La flore mésophile totale		$2,275.10^4$	$2,98.10^5$
Lactobacillus lactiques	37°C	Abs	$2,24.10^5$
	44°C	Abs	$3,885.10^2$
Streptococcus lactiques	37°C	Abs	$1,18.10^4$
	44°C	Abs	60
Levures et moisissures		30	$7,205.10^2$
Coliformes totaux		Abs	$3,4.10^4$
Coliformes fécaux		Abs	Abs
Streptococcus fécaux		Abs	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i>		Abs	

Les résultats obtenus montrent que les laits analysés sont conforme aux normes établies par JORA(1998). Que se soit pour le lait cru ou lait cru de mélange pasteurisé. Donc la matière première est de bonne qualité.

✓ Flore mésophile aérobie totale

Dans le cas du lait de mélange pasteurisé le résultat $2,27.10^4$ est conforme a la norme établie dans le journal officiel qui est du 10^5 UFC/ml, par contre dans le cas du lait cru n'ayant subit aucun traitement thermique le résultat obtenu qui est du $2.98.10^5$ dépasse la norme, ceci peut être expliqué par l'absence de pasteurisation ou de microfiltration.

La flore mésophile aérobie totale est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination. Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du lait cru et permet de suivre son évolution au cours de sa transformation. Ainsi le nombre de germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de décomposition (altération) du lait (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

✓ Flore lactique

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans les équilibres microbiens du lait CARIDI *et al*, (2003).

❖ *lactobacilus*

Le lait de mélange pasteurisé analysés semble être dépourvus de lactobacilles mésophiles et thermophiles par contre le lait cru analysés contient $2.24.10^5$ UFC/ml dans le cas des mésophiles et 4.10^4 UFC/ml dans le cas des thermophiles, le nombre de mésophiles étend plus important que celui des thermophiles. Nos résultats semblent être plus importants que ceux d'autres études. Selon DESMASURES *et al*, (1997) ; MICHEL *et al*, (2001) ; TORMO *et al*, (2006) ; MALET *et al*, (2010). Les niveaux de lactobacilles retrouvés dans les laits crus sont assez faibles pour les laits de vache et de chèvre. Ils se situent entre 10 et 100 ufc.ml⁻¹

Les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus ubiquitaires (DESMAZEAUD, 1992), leurs absence dans le lait de mélange est le résultat de la pasteurisation, ces bactéries seront apportés par le levain lors de la fabrication fromagère, par contre lors de la fabrication fermière les ferments sont apportés par le lait cru lui même, ces derniers peuvent s'implanter et se développer dans les fromages avec une forte capacité invasive. Dans le Comté, BOUTON *et al*, (2002) ont montré que *lactobacilles* originaire du lait cru se maintenait dans les fromages, alors que les lactobacilles utilisées comme levain, avait disparu en quatre semaines dans le Cheddar.

❖ Streptocoques lactiques

Les *streptococcus lactiques* thermophiles et même mésophiles semblent être absentes dans le lait de mélange pasteurisé.

Dans le lait cru le nombre de streptocoques est de $1.7.10^4$ UFC/ml pour les mésophiles et 60UFC/ml des streptocoques thermophiles dans le lait analysés.

Les streptococcus lactiques jouant un grand rôle dans la protéolyse des caséines et des peptides dans le fromage jusqu'au stade des acides aminés KAWAI *et al*, (1999) ; WASILJEVIC *et al*, (2005). Cependant, il a été clairement démontré que les streptocoques lactiques du levain exercent un rôle déterminant dans la formation de la flaveur du fromage comme le Cheddar. On obtient des fromages de Cheddar de bonne qualité organoleptique lorsqu'on utilise comme levains des cultures pures de streptocoques qui sont incapable d'atteindre des populations maximales élevées dans le caillé, qui associe d'une part la flaveur médiocre et l'amertume lorsque ces bactéries atteignent 10^{10} UFC/g.

✓ Coliformes totaux

Les coliformes totaux semblent être absents dans le lait de mélange pasteurisé, et avec une valeur de $3,4 .10^5$ UFC/ml dans le cas du lait cru analysés. La réglementation algérienne

ne définit pas une norme pour cette flore dans le lait. Nos résultats sont inférieurs à ceux trouvés par des études similaires OUNINE *et al*, (2004) avec $1,01.10^7$ UFC/ml au Maroc.

Actuellement en France il est courant d'avoir des niveaux de contamination inférieur à 10^4 UFC/ml DESMASURES *et al*, (1997) ; MICHEL *et al*, (2001) ; TORMO *et al*, (2006)

Lorsque les coliformes sont à des niveaux élevés dans les laits ou encore dominants, ils sont responsables des gonflements précoces des fromages COIFFIER, (1992) ; DEMARIGNY *et al*, (1997), du fait de la production de gaz carbonique et d'hydrogène très peu soluble dans le lait. Ils peuvent conférer un aspect spongieux au fromage (BEUVIER *et FEUTRY*, 2005).

✓ Coliformes et streptocoques fécaux

Les résultats montrent l'absence des coliformes fécaux dans le lait cru et aussi le lait cru de mélange pasteurisé. Ceci témoigne les bonnes conditions de la traite ainsi que le respect de l'hygiène.

Leurs dénombrements est intéressent car les coliformes thermotolérants sont considérés comme des indicateurs de contamination fécale, c'est-à-dire que leur présence souligne un risque potentiel de présence de pathogènes entériques comme les salmonelles.

✓ *Staphylococcus aureus*

La recherche des staphylocoques dans les deux types du lait est négative. Des études similaires faites sur différents pays méditerranéen France, Portugal, Grèce, présentent des niveaux moyens en staphylococcus aureus respectivement $2,75.10^2$ UFC/ ml, $7,6.10^4$ UFC/ml et $1,7.10^5$ UFC/ml (MORGAN *et al*, 2003).

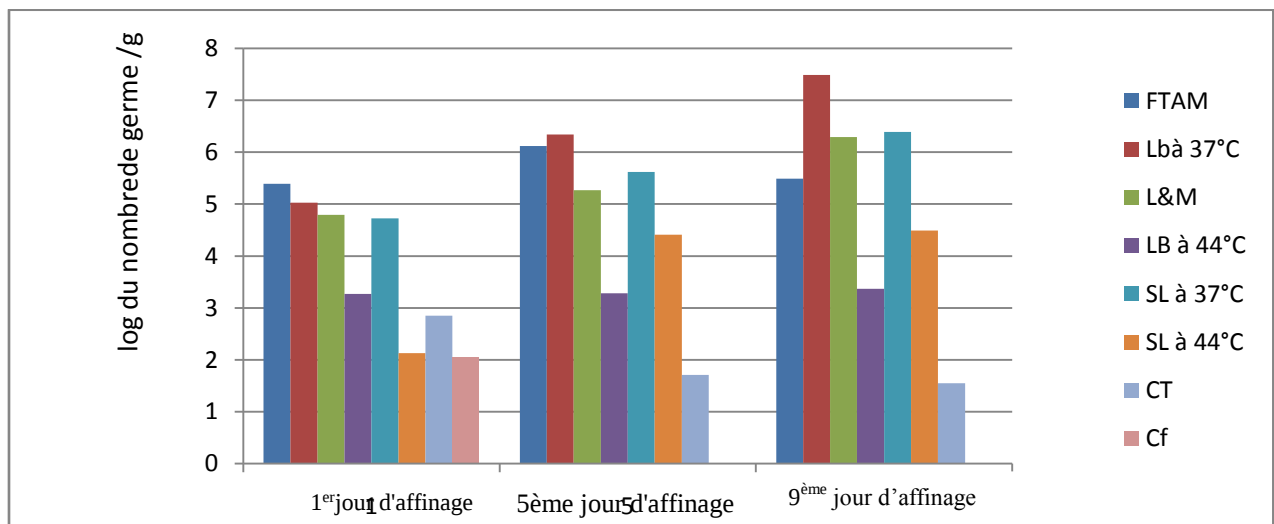
La norme Européenne pour les fromages au lait cru impose de rechercher la toxine staphylococcique lorsque le niveau de *S.aureus* dépasse 10^5 ufc.g⁻¹ de fromages (Règlement Européen 2073 / 2005).

La microflore du lait signe l'identité du fromage. La nature de la microflore détermine les caractéristiques de goût et sa diversité. Elle devient rapidement dominante dans le fromage en affinage, la diversité de la microflore peut faire barrière aux flores pathogènes. Les pratiques vont influencer la microflore du lait et fromage (hygiène, soins et état des trayons, conception et nettoyage du matériel de traite et de stockage, conception des locaux et pratiques d'élevage).

III.3.2. Moyennes des résultats d'analyses microbiologiques des différents types de fromage

Fromages industriel

Les différents résultats issus de dénombrement du groupe microbien et recherche des pathogènes dans le camembert industriel « Fermier » sont présentés dans la figure suivante:



FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale, **LB** : Lactobacillus, **SL** : *Stréptococcus Lactique*,

CT : Coliformes Totaux, **CF** : Coliformes Fécaux, **L&M** : Levures & Moisissures.

Figure23 : Evolution de la flore microbienne au cours de l'affinage.

III.3.2.1. Dénombrement des principales flores

✓ Flore mésophile aérobie totale

Le nombre des germes totaux varie tout au long de l'affinage, à partir de lait jusqu'au premier jour d'affinage, cette flore évolue d'une manière progressive du premier jour d'affinage jusqu'au cinquième jour, en partant d'une valeur égale à $2,47 \cdot 10^5$ UFC/g jusqu'au $1,32 \cdot 10^6$ UFC/g

À partir du cinquième jour d'affinage, on remarque une évolution régressive de la flore mésophile totale pour atteindre $3,14 \cdot 10^5$ UFC/g au dernier jour d'affinage. Ceci peut être expliqué par l'acidification du milieu par les bactéries lactiques. L'analyse statistique permet de conclure qu'il n'existe pas de différence significative du nombre des FMAT tout au long de l'affinage voir annexe (29).

Selon Sutra et *al*, (1998). Les valeurs élevées de FTAM n'indiquent pas nécessairement la présence de pathogènes, vu que même a des valeurs basses peuvent accompagner la présence de pathogènes à des niveaux dangereux.

❖ Coliformes

✓ Coliformes totaux

D'après les résultats obtenues, on remarque une diminution des coliformes totaux qui passent de $7,13.10^2$ au premier jour d'affinage jusqu'au $3,6.10^1$ UFC /g, cette baisse peut être due à la diminution du Ph par l'acidification du milieu par les bactéries lactiques.

✓ Coliformes fécaux

Les résultats de dénombrement évoluent d'une manière régressive qui varie de $1,66.10^1$ UFC/g au premier jour d'affinage pour disparaître carrément au dernier jour d'affinage. Cette baisse est due soit à la baisse du ph ou à la présence d'activité biologique au sein du fromage. La valeur obtenue est conformes à la norme établie par le JORA(1998) qui est de 10UFC/gde fromage.

- Selon BENHAMMOUCHE, (2005); GUESSAS *al*, (2006) et SAIDI, (2007), la production d'acides organiques et d'autres composés antimicrobiens, telles que les bactériocines, jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes contaminants.

✓ Streptococcus fécaux

Les résultats de dénombrement de ce germe est négative tout au long de la fabrication du camembert à partir de lait jusqu'au dernier jour d'affinage, ceci témoigne le respect des bonnes conditions d'hygiène lors de la traite et au cours de la fabrication.

✓ La flore lactique

❖ Lactobacilles

Le nombre des lactobacilles est important tout au long de la fabrication du camembert, celui-ci varie entres $1,07.10^5$ jusqu'au $3,14.10^7$ UFC/g pour les mésophiles et de $1,87.10^3$ jusqu'au $2,38.10^3$ UFC/g, on remarque que le nombre des mésophiles est plus important que le nombre des thermophiles.

❖ Streptococcus lactique

Tout comme les lactobacilles les streptococcus lactiques évolue d'une manière importante tout au long de l'affinage pour atteindre à la fin d'affinage une valeur de $1,16.10^6$ UFC/g de fromage pour les mésophiles et une valeur de $3,1.10^4$ UFC/g, avec un développement important des mésophiles par rapport aux thermophiles.

Nos résultats sont proches de ceux portés par AISSAOUI ZITOUN et al, (2011) avec des valeurs de 10^6 à 10^7 UFC/g en analysant la microflore de bouhezza.

La flore lactique joue un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique. Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (YATEEM et al, 2008).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (DORTU et THONART, 2009).

La principale fonction des bactéries lactique est du acidifier le lait, ces bactéries jouent aussi un rôle dans la production d'arômes tout en dégradant les lipides et les protéines. Selon DESMAZAUD, (1998) les bactéries lactiques ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres, ou des peptides courts, ce qui fait que leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines du lait, et notamment les caséines, par des enzymes (les protéases) situées dans la paroi extérieure de la cellule.

✓ Levures et moisissures

La croissance des levures et moisissures s'effectue d'une manière intense à partir du premier jour d'affinage avec une valeur de $6,21.10^4$ UFC/g jusqu'au dernier jour d'affinage pour atteindre une valeur de $1,96.10^6$ UFC/g de fromage. Ceci est rendu possible grâce à leurs forte tolérance aux faibles pH et peuvent se développer jusqu'à la neutralité, car lors de leurs développement elle alcalinise la surface par la consommation de l'acide lactique et permet aux autres microorganismes ne tolérant pas les faibles pH de se développer.

Les levures et moisissures jouent un rôle important que se soit dans l'apparence du camembert mais aussi dans la production d'arômes. L'étude statistique a permis de conclure qu'il n'existe pas de différences significative pour cette flore au long de l'affinage voir annexe (30).

III.3.2.2. Recherche des pathogènes

Les résultats de la recherche d'*E.coli* et *S.aureus* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XII : recherche des bactéries pathogènes dans le fromage « Fermier ».

	1j d'affinage	5j d'affinage	9j d'affinage
<i>S.aureus</i>	Abs	Abs	Abs
<i>E.coli</i>	Abs	Abs	Abs

Les deux bactéries pathogènes sont absentes tout au long de l'affinage du camembert « Fermier ».

❖ *S.aureus*

Les résultats obtenus montrent l'absence de ce germe tout au long de la fabrication du fromage, ce qui est conforme à la norme établie par le JORA(1998).

La recherche de ce germe est très intéressante vu le pouvoir pathogène de certaines espèces de staphylocoques, qui est dû à la production d'une enterotoxine, elle n'est détruite ni par la pasteurisation du lait, ni au cours de l'affinage des fromages. (EL ATYQY, 2008).

L'ingestion de toxine produite par *S.aureus* provoque des troubles gastro-intestinaux causant une déshydratation qui peut être grave chez des sujets à risque.

❖ *E. coli*

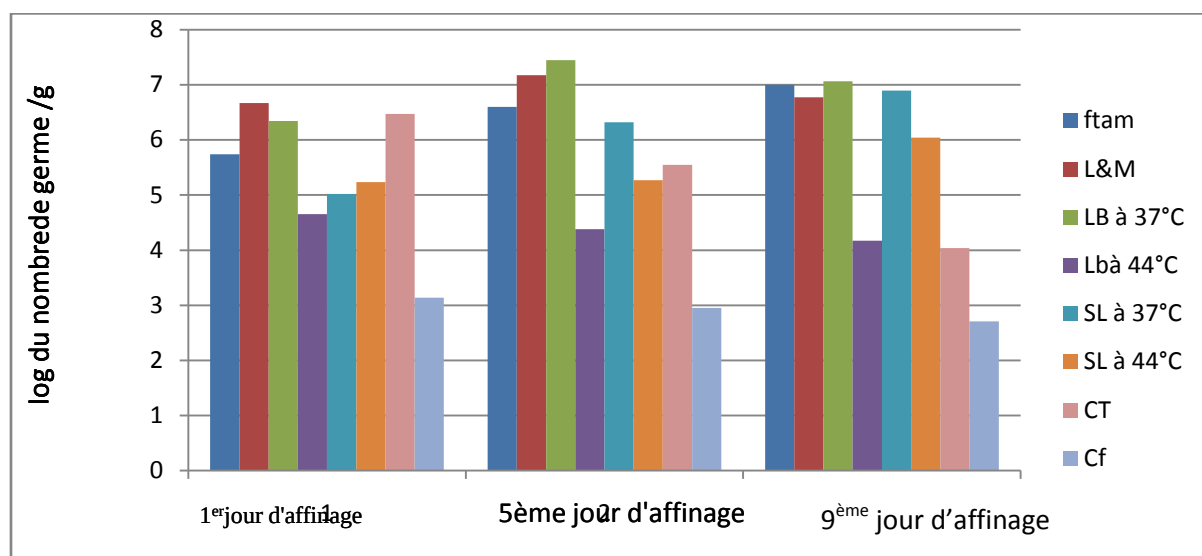
Leurs dénombrements sont intéressants car les coliformes thermotolérants sont considérés comme des indicateurs de contamination fécale. Les souches de *Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où ils jouent généralement le rôle de bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite à des infections extra-intestinales de l'appareil urinaire, et du sang. Le serotype O157:H7 est le plus fréquent chez l'homme.

L'absence des deux bactéries pathogènes dans le camembert « Fermier »

La recherche des bactéries pathogènes dans le camembert « fermier » fabriqué à base de lait pasteurisé semble être négative. Ce qui peut être expliqué par les conditions physicochimiques de la masse fromagère défavorables à leur croissance. Par exemple la baisse du pH grâce aux acides organiques qui sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation qui permettent d'inhiber la croissance des bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. La pasteurisation du lait aussi élimine une grande partie des bactéries indésirables et l'absence de celle-ci tout au long de la fabrication témoigne l'absence d'une recontamination et le respect des conditions d'hygiène au long de la fabrication.

Fromages artisanal

Résultats microbiologique du fromage artisanale du type camembert « Saint amour » sont présentés dans la figure suivante :



FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale, **LB** : Lactobacillus, **SL** : *Stréptococcus Lactique*,

CT : Coliformes Totaux, **CF** : Coliformes Fécaux, **L&M** : Levures & Moisissures.

Figure 24 : Evolution de la flore microbienne au cours de l'affinage.

III.3.3. Interprétation des résultats

✓ La flore mésophile aérobie totale

Cette flore évolue progressivement au cours d'affinage en partant de $3,69 \cdot 10^6$ UFC/g au premier jour d'affinage pour atteindre une valeurs de $2,77 \cdot 10^8$ UFC/g au dernier jour d'affinage. Cette valeurs semble être plus importante dans ce fromages artisanal par rapport au fromage industriel ceci peut être expliqué par l'absence de la pasteurisation dans la fabrication artisanale.

Nos résultats ressemble a ceux trouvés ABDELHAK DRIOUICH *et al*, (2011) avec une moyennes de $1,14 \cdot 10^7$ UFC/g. et DUCASTELLE et LENOIR, (1965) avec 10^8 UFC/g.

Selon HASSOUNA *et al* (1996), ce développement accrue peut être expliqué par la désacidification de la pâte autrement dit **Phase de neutralisation** après le développement du *Penicillium* cette désacidification permet l'implantation de la flore acido-sensible et halotolérante en surface.

✓ **Coliformes totaux**

Vu l'absence de la pasteurisation et la traite manuelle et la fabrication artisanale dans ce types du fromage, les coliformes totaux se manifestent à des valeurs importantes, ces derniers baisse au fil de l'affinage.

✓ **Coliformes fécaux**

Les résultats du dénombrement de cette flore varient tout au long de l'affinage avec une valeur égale à $1.4.10^3$ UFC/g au premier jour d'affinage qui semble être élevé par rapport a la norme établie par le JORA(1998) qui est de 10^3 . Cette valeur tend à diminuer tout au long de la maturation.

Après le premier jour d'affinage cette flore évolue d'une manière régressive pour atteindre des valeurs de $5,6.10^2$ au dernier jour d'affinage, ce résultat qui est en adéquation avec la norme cité auparavant. Ces valeurs restent inférieures à ceux déclarés par HAMAMA, (1989) qui sont 2.10^4 UFC/g.

Cette diminution peut être expliquée par le ph acide du camembert ou bien par la présence de substances inhibitrices qui ont freiné leurs proliférations.

✓ **Streptococcus fécaux**

Le dénombrement des streptococcus fécaux à révélé l'absence de ce germe tout au long de la fabrication du ce fromage artisanal, ceci peut être expliqué par le respect des conditions d'hygiène lors de la traite et la fabrication fromager. Le dénombrement de ces germes semble très intéressent vu que ces germes sont parmi ceux qui résistent le mieux à des conditions de milieu défavorables. Ils résistent mieux que les coliformes et *E.coli* à la réfrigération, à la congélation, au chauffage, à la salaison et à la dessiccation (CUQ, 2007) et sont, donc selon certains auteurs de meilleurs indicateurs de la qualité hygiénique du lait (WAES, 1973).

Ces germes sont moins souvent associés aux germes pathogènes que les coliformes fécaux. Ils ne renferment pas d'espèce considérée pathogène du point de vue alimentaire. Cependant, après prolifération abondante dans l'aliment, ces germes peuvent être à l'origine de toxi- infections bénignes (CUQ, 2007).

✓ **La flore lactique**

Le dénombrement de la flore lactique indigène du lait montre que cette flore étant majoritaires dans ce lait.

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans les équilibres microbiens du lait. Ainsi, leur développement excessif ou insuffisant peut induire des défauts de texture et de goût des fromages. Elles constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (CARIDI *et al*, 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du

peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutérine, du diacétyle et des bactériocines (DORTU et THONART, 2009).

❖ Lactobacilles

Les lactobacilles évoluent d'une manière importante pour atteindre au dernier jour d'affinage une valeur égale à $1,16.10^7$ UFC/g pour les mésophiles et une valeur de $1,4.10^4$ UFC/g pour les thermophiles, le nombre de mésophiles est plus important que celui de thermophiles. Cette flore semble être plus importante dans ce camembert artisanale par rapport au camembert industriel ceci est confirmé par l'analyse statistique qui nous donne une différence significative pour le même paramètre dans deux sortes de fromage avec une p-value de 0.01 voir annexe

❖ Streptocoque lactique

Les streptocoques lactiques évoluent d'une manière significative tout au long de l'affinage d'une manière similaire aux lactobacilles avec une valeur de $7,8.10^7$ UFC/g pour les mésophiles et $8,08.10^5$ UFC/g pour les thermophiles. Cette flore semble être plus importante dans ce camembert par rapport au camembert industriel ceci est confirmé par l'analyse statistique comparative qui nous donne une différence significative au dernier jour d'affinage avec une p-value de 0.02 voir annexe

- La flore lactique joue un rôle important dans la phase de l'acidification. Les streptocoques sont les premiers germes acidifiants intervenant par abaissement du pH et par augmentation de l'acidité, puis viennent les lactobacilles acidophiles qui, en proliférant, abaissent davantage le pH et entravent la croissance d'autres germes. Cette phase se poursuit jusqu'à la coagulation du lait par acidification (maximum pH 4,6) (PETRANSXIENE et LAPIED, 1981).

✓ Levures et moisissures

Les levures et moisissures évoluent d'une manière importante lors de l'affinage pour atteindre une valeur maximale au dernier jour d'affinage qui est de $5,9.10^6$ UFC/g. Leurs croissances sont favorisées par le pH acide du milieu ainsi la consommation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques.

Les levures et les moisissures désacidifient la surface des fromages. En oxydant le lactate, du CO_2 est émis, celui-ci contribue à l'augmentation du pH qui passe de 4,8 à 5,8, voir plus, Ils sont considérés comme des microflores d'intérêt technologique en transformation fromagère. Largement employé comme levain d'affinage en particulier pour les fromages à pâte molle et à croûte fleurie, POTTIER *et al*, (2008). Les levures et moisissures jouent un rôle important que se soit dans l'apparence du camembert mais aussi dans la production d'aromes.

Recherche de bactéries pathogènes

Deux bactéries pathogènes ont été recherché dans le camembert fermier « Saint amour » les résultats obtenus sont présenté dans le tableau suivant :

Tableau XIII: résultats de la recherche des bactéries pathogènes dans le camembert « Saint amour »

	1jd'affinage	6j d'affinage	12jd'affinage
<i>S.aureus</i>	Abs	Abs	Abs
<i>E.coli</i>	Abs	Abs	Abs

La recherche des deux bactéries pathogènes *E.coli* et *S.aureus* est négative tout au long de l'affinage du camembert fermier.

❖ *Staphylococcus aureus*

Il est très utile de rechercher cette bactérie pathogène dans le fromage vu le pouvoir pathogène de cette bactérie productrices d'une enterotoxine, elle n'est détruite ni par la pasteurisation du lait, ni au cours de l'affinage des fromages (FATET, 2004).

La norme Européenne pour les fromages au lait cru impose de rechercher la toxine staphylococcique lorsque le niveau de *S.aureus* dépasse 10^5 ufc.g⁻¹ de fromages (Règlement Européen 2073 / 2005)

❖ *E. coli*

Escherichia coli fait partie du groupe des coliformes fécaux dont l'origine essentielle est le tube digestif, qui sont plus thermotolérants (détectés à 44°C). Dans le domaine de la microbiologie des denrées alimentaires, *E. coli* sert en général d'indicateur de contaminations fécales. Si la majorité des souches d'*E.coli* sont commensales, certaines sont à l'origine de diverses pathologies intestinales. Les ***E. coli* pathogènes** sont considérés comme responsables de toxi-infections alimentaires. *E. coli* O157 : H7 est le principal sérotype à l'origine de pathologies chez l'homme.

La recherche des bactéries pathogènes dans le camembert « Saint amour » fabriqué à base du lait cru n'ayant subi aucun traitement thermique semble être négative. Ce qui peut être expliqué par les conditions physicochimiques de la masse fromagère défavorables à leur croissance. Par exemple le pH, lorsque celui-ci s'éloigne de la neutralité la survie des

bactéries semble affecté négativement. Selon VIGNOLA, (2002) Les acides organiques qui sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide.

Encore une fois Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la conservation des produits alimentaire, elles sont capables de produire une variété de produits inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi sur la flore indésirable ou pathogène (PIARD et DESMAZAUD, 1991).

III.4.Résultats des activités biologiques dans le fromage

III.4.1.Détermination de l'activité antibactérienne en milieu gélosé

❖ Méthodes des disques

Les résultats obtenus par la méthode des disques testés sur les extraits fromagers des deux types de camembert, artisanale « Saint amour » et industriel « Fermier » vis-à-vis *staphylococcus aureus* et *E. coli* montrent l'apparition des halos transparents autour des disques imbibés de B et N, ces halos correspondent à des zones d'inhibitions.

L'élimination de l'effet des acides organiques, notamment des acides lactiques et acétiques par la neutralisation des extraits fromagers et ciblé le centre du fromage afin d'éviter l'effet de H_2O_2 n'entraînent pas la diminution du diamètre d'inhibition et montre que ces halos sont dus à des substances autres que les acides organique vis-à-vis *S.aureus* et *E.coli*, par contre l'absence des zones d'inhibition autour du T, témoigne que celui-ci ne contient pas de substances inhibitrice. Les images suivante montre les différentes zones d'inhibition obtenues vis-à-vis *E.coli* et *S.aureus* dans les deux types du camembert « Saint amour » et « Fermier ».

Figure 25 : les zones d'inhibitions obtenues vis-à-vis *E.coli* dans les deux types du camembert.

Figure 26 : les zones d'inhibitions obtenues vis-à-vis *S.aureus* dans les deux types du camembert.

Les résultats obtenus par cette méthode aussi présentent des zones d'inhibitions que se soit pour le surnagent brute et neutralisé et absence de celle-ci dans le témoin, les résultats sont présentés dans les figures suivantes :



Figure 27 : zones d'inhibition obtenues vis-à-vis *E. coli* et *S. aureus* dans les deux types de fromages.

D'après les résultats obtenus par les deux méthodes cités, on conclut que les deux types de fromages artisanale et industriel possèdent un caractère antibactérien vis à vis les deux souches pathogènes *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*.

Ce caractère est largement rechercher dans la bioconservation des aliments, cette méthode biologique qui a fait l'objet de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires comme le fromage, grâce à l'utilisation de microorganismes et/ ou de leurs métabolites (ROSS *et al*, 2002, STILES, 1996).

Selon deVUYST *et al*, (2007), les écosystèmes microbiens implantés sur les matrices fromagères exercent des effets protecteurs vis-à-vis de l'implantation d'autres flores par un ensemble de mécanismes plus ou moins spécifiques. En plus de mécanismes généraux comme la compétition nutritionnelle, de nombreuses souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser des bactériocines.

Selon GALVEZ *et al*, (2008) Les lactobacilles sont souvent utilisés lors de la fermentation de fromages comme le Manchego ou le Camembert en raison de ses propriétés antibactériennes dirigées contre *L. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

Les bactériocines pourraient être des conservateurs alimentaires intéressants à l'échelle industrielle du fait de leur thermostabilité de leur spectre d'activité relativement étroit.

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles. En plus de l'effet protecteur de l'acide lactique, l'acide acétique, le diacétyle et le peroxyde d'oxygène, la découverte des bactériocines a donné un élan pour le développement d'aliments de qualité sanitaire meilleure.

En plus des bactériocines, d'autres peptides pourraient jouer un rôle dans la conservation de certains fromages traditionnels : des fragments antimicrobiens de protéines laitières ont été mis en évidence dans des fromages italiens tels que le Pecorino Romano, le Canestrato Pugliese, le Crescenza, et le Caprino del Piemonte (RIZZELLO *et al*, 2005) ou très récemment dans le Cheddar (PRITCHARD *et al*, 2010). Ces fragments de caséine seraient libérés par les différentes enzymes protéolytiques qui agissent sur ces protéines tout au long de l'itinéraire technologique d'élaboration d'un fromage et notamment au cours de l'affinage.

L'étude de l'activité anti-*Listeria* de composés hydrosolubles du fromage italien Asiago d'alleva a mis en évidence la présence d'un potentiel antibactérien. Ce potentiel semble essentiellement lié à la présence de composés de poids moléculaire inférieur à 1 kDa, il est donc plus probable que l'activité antimicrobienne observée soit essentiellement due à des fragments peptidiques de petite taille des caséines qu'à des bactériocines (NGUYEN- THI *et al*, 2006).

Plusieurs études similaires ont mis en évidence la présence naturelle de peptides bioactifs dans des produits laitiers traditionnels comme les fromages (MEISEL *et al*, 1997 ; SAITO *et al*, 2000 ; RIZZELLO *et al*, 2005 ; BÜETIKOFER *et al*, 2007).

SILPHA VIJ, (2014) *et al* ont pu sélectionner les bactéries lactiques qui présentent le plus fort pouvoir protéolytique vis-à-vis des caséines du lait ainsi de déterminer l'activité antimicrobienne des peptides issus de l'hydrolyse des caséines envers plusieurs bactéries pathogènes parmi eux *E. coli* et *S. aureus*. Ils ont pu montrer la forte activité protéolytique des lactobacilles sélectionnés ainsi que la forte activité antimicrobienne des peptides issus de l'hydrolyse envers les bactéries pathogènes testées.

Des études comparant la protéolyse d'un fromage Cheddar fait avec ou sans ferment lactique ont démontré l'importance de l'utilisation de ces microorganismes pour la libération de petits peptides et acides aminés au fil de l'affinage (LYNCH *et al*, 1996; Lane et Fox, 1996; FARKE *et al*, 1995). (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

En complément de la baisse du pH et/ou d'activité de l'eau, de la présence d'un écosystème microbien implanté sur la matrice fromagère, la présence de peptides antimicrobiens pourrait constituer un mécanisme complémentaire concourant à sa conservation.

Les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse des protéines du lait notamment les caséines peuvent remplacer les antibiotiques et les additifs dans la conservation des aliments vu leur abondance, bon marché et ne présentent aucun danger pour la santé.

III.4.2.Détermination de l'activité antibactérienne en milieu liquide

Dans le but de confirmer les résultats de l'activité antibactérienne en milieu solide MH, l'étude a été poursuivie en milieu liquide par le suivi de la croissance de *staphylococcus aureus* et *E. coli* avant et après 24 heures de culture.

L'activité antibactérienne a été testée sur les deux types de fromages « fermier » et « saint amour », au premier et dernier jour d'affinage de trois productions différents de chaque type de fromages.

❖ Camembert industriel « Fermier »

Les résultats de la mesure de la densité optique avant et après 24 heures sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XIV : suivi de la densité optique avant et après 24 h des cultures microbiennes.

Souche		Témoin	Brute	Neutralisé	9 ^{eme} jour d'affinage	Témoin	Brute	Neutralisé
1 ^{er} jour d'affinage								
<i>E. coli</i>	Avant	0.144	1.285	0.685	Avant	0.103	1.149	0.989
	Après	1.033	0.716	0.456	Après	1.118	0.532	0.311
<i>S. aureus</i>	Avant	0.30	1.234	0.645	Avant	0.014	1.578	1.211
	Après	1.076	0.625	0.367	Après	1.071	0.602	0.342

❖ Camembert artisanal « Saint amour »

Les résultats de la mesure de la densité optique avant et après 24h sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XV : croissance de *staphylococcus aureus* et *E.coli* avant et après 24 h à une densité optique égale à 620nm

Souche / 1 ^{er} jour d'affinage		Témoin	Brute	Neutralisé	12 ^{ème} jour d'affinage	Témoin	Brute	Neutralisé
<i>E. coli</i>	Avant	0.230	1.313	0.823	Avant	0.132	1.305	0.987
	Après	1.102	0.617	0.456	Après	1.219	0.611	0.421
<i>S. aureus</i>	Avant	0.223	1.056	0.989	Avant	0.169	1.578	1.212
	Après	1.090	0.564	0.423	Après	1.092	0.602	0.342

La croissance des bactéries est suivie par la mesure de la densité optique avant et après 24 heures d'incubation.

Les DO mesurés tendent à diminuer significativement par rapport à la DO mesuré au départ ainsi à celle du témoin ou les souches cibles se prolifèrent significativement après 24 heures de culture. Ceci est valable pour les deux types du camembert analysés.

Les DO obtenues semblent diminuer dans les 2 types d'échantillon brut et neutralisé ce qui élimine l'effet du pH.

Les résultats obtenus confirment ceux observés en milieu solide et affirment qu'il ya inhibition vis-à-vis les deux souches pathogènes.

Cette inhibition semble être plus importante au dernier jour d'affinage par rapport au premier jour d'affinage.

Les durées d'affinage pour assurer l'affirmation des qualités organoleptiques des fromages impliquent que ces produits aient été le siège d'une protéolyse importante avant commercialisation. Ceci en fait des sources quantitatives potentiellement importantes de peptides (DUPAS et al, 2004).

Vu l'élimination de l'effet du pH par la neutralisation du surnagent et H₂O₂ en évitant la croute du fromage, cette inhibition ne peut être du qu'à la production des substances antibactériennes présentes dans le surnagent (NOONPAKDEE et al, 2003).

III.4.3. Résultats des activités anti oxydantes et anti radicalaires

Tableau XVI: résultats de l'activité anti-oxydante dans le lait.

produit activité	Lait		Fromages			
	Lait cru	Lait de mélange	fermier		Saint amour	
			J1	J9	J1	J12
Activité anti-radicalaires (%)	0.001	0.029	0.048	0.057	0.049	0.074
Pouvoir réducteur (FRAP) (%)	0.02	0.016	0.026	0.041	0.026	0.073

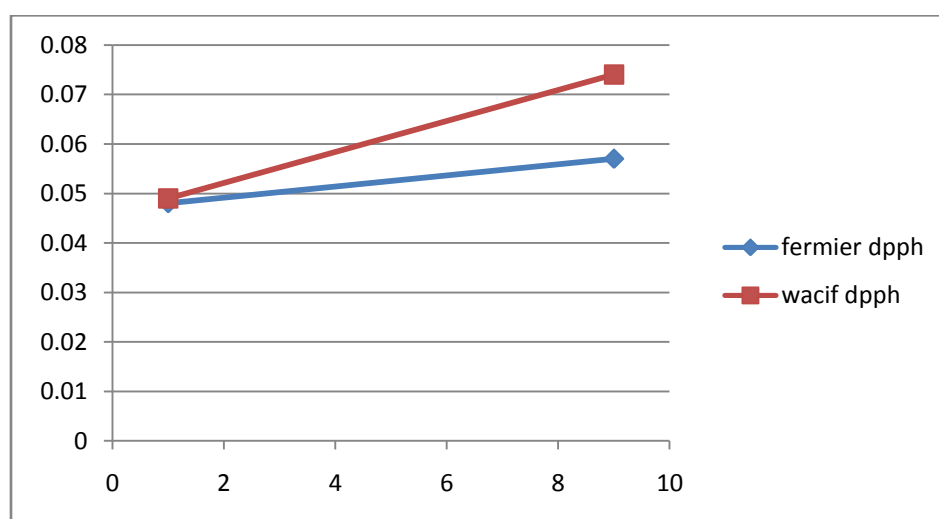


Figure 28 : Evolution du pouvoir anti-radicalaire des fromages au cours de l'affinage.

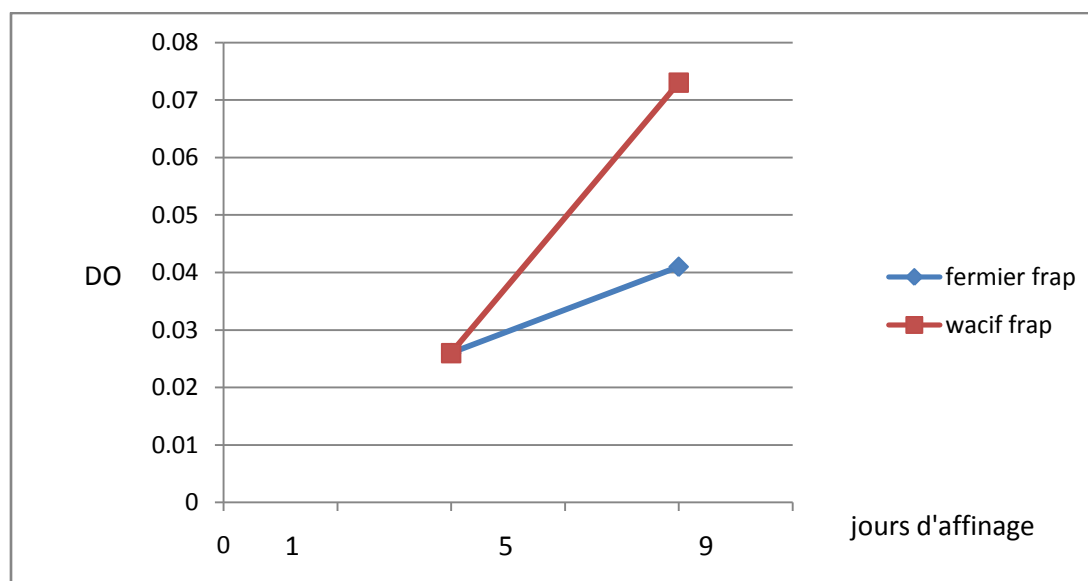


Figure 29 : Evolution du pouvoir chélateur des fromages au cours de l'affinage.

D'après les résultats obtenus, on remarque une évolution remarquable de l'activité antioxydante au cours de l'affinage pour les deux types de fromages, avec une proportion plus intense dans le camembert artisanal « Saint amour ».

L'augmentation se distingue aussi entre le lait et le fromage et aussi entre le fromage au premier jour par rapport au dernier jour d'affinage ceci est plus remarquable dans le fromage « saint amour » ceci est confirmé par l'analyse statistique du pouvoir chélateur et anti-radicalaire au cours de l'affinage qui montre une différence significative au près de ce fromage du premier jours au dernier jours d'affinage avec des valeurs p-value égale à 0.025 dans le cas du DPPH et 0.007 dans le cas du FRAP voir annexe (28).

Selon CORHONEN et PIHLANTO, (2006) Plusieurs peptides bioactifs originaire des protéines du lait ont montré leurs activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne et antioxydants. RECICO et *al*, (2007) ont aussi testé et approuvé les activités biologiques des peptides issus de l'hydrolyse des caseines. ces résultats concordent avec les travaux de DR SANTOSH KUMAR et *al*, (2013), DILEK DEMIRBUKER KOVAK ET BILAGE AKDENIZ, (2016) ces derniers ont montrés une très importantes activité antioxydant des peptides issus de l'hydrolyse des caséines par différents enzymes.

D'après WOLOSIAK (2006), en plus d'une source des acides aminés les caséines peuvent jouer un rôle comme antioxydant, ce qui est peut être lié à la capture des radicaux libres par les résidus d'histidines. SAIGA et *al*, (2003), ont aussi attribués le pouvoir antioxydant des protéines aux acides aminés issus de leurs hydrolyses, Cette activité antioxydante est donc liée à la teneur en caséines vu que c'est la major protéines du lait.

HAYES et *al*, (2007) ont montrés que la combinaison suivante d'acides aminés (Pro-his-his) été identifié comme le centre de plusieurs peptides qui ont un pouvoir anti-oxydant.

Les caséines sont présentes dans le lait sous forme de micelles, les majeurs caséines α , β et κ diffèrent l'une de l'autre par leur teneur en phosphate (ESKIN, 1985). Ce phosphate peut être lié à l'activité antioxydante des caséines, CERVATTE et al (1990, 1993), VIANI et al (1990), ont montrés le fort pouvoir antioxydant des molécules contenant du phosphate dans l'oxydation des lipides.

Selon IRSHAD et al, (2013), les fractions avec 1KDa issus de l'hydrolyse des caséines présentaient le maximum pouvoir de chélation des radicaux libres. Des études similaires avaient montrés que les peptides ayant moins de 3KDa exerçaient la plus forte activité antioxydante par rapport à d'autres peptides ayant plus de 3KDa (CHANG et al, 2013).

Selon BLANDRAS, (2008) L'hydrolyse des caséines par les protéases microbiennes permet de libérer les peptides bioactif qui restent inactifs lorsqu'ils sont inclus dans les séquences de la protéine dont ils sont issus. Une hydrolyse des caséines a été obtenues après 48 heures de fermentation par les lactobacilles, la capacité antioxydante des fractions peptidiques libérées est significativement plus élevée que celle du lait au départ (BALKALOUL et al, 2014).

L'hydrolyse des caséines αS_1 par les enzymes du lait et les protéases microbiennes donnent naissance à des peptides riches en histidine et sont chargés positivement ce qui leur confère un potentiel anti radicalaire. Ces peptides s'accumulent durant l'affinage et avec ceci augmente le pouvoir réducteur et anti radicalaire du fromage (ARDO et al, 2009).

En effet, dans notre étude on a remarqué une évolution de l'activité antioxydante testée sur les deux types de camembert entre le lait et le camembert mais aussi entre les différents stades d'affinages.

L'ingestion des protéines alimentaires donc pourrait aller au delà de l'apport d'azote et d'acides aminés essentiels à l'organisme. La protéolyse accompagnant l'affinage des fromages libère un grand nombre de fragments de caséines dont certains présentent des activités biologiques ces fragments tendent à s'accumuler durant l'affinage ce qui explique l'évolution de l'activité antioxydante avec la maturation du camembert.

Références Bibliographiques



ABBAS A, DOBSON ADW (2011) Yeasts and Molds | *Penicillium camemberti*. In: Editor-in-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 776-779.

ABBAS A, DOBSON ADW (2011) Yeasts and Molds | *Penicillium roqueforti*. In: Editor-in-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 772-775.

ALAIS C. (1975). Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris.

ALAIS C., (1984) : Science du Lait ; Principe des Techniques Laitières. SEPAIC, 4^{ème} Ed, Paris

ALAIS C. et LINDEN G., (1997). Abrégé de biochimie alimentaire. 4^{ème} Ed. Masson, 248 p.

ALAIS C., LINDEN G. et MICLO L. (2008). Biochimie alimentaire, Dunod 6^{ème} édition. Paris. pp :86-88.

AMIOT J., FOURNER S., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R et TURGEON H.,(2002) Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait In **VIGNOLA C.L**, Science et technologie du lait – Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN:3-25-29 (600 pages).

ARDO, Y., PRIPP, A.H., LILLEVANG, S.K.(2009) Impact of heat-treated lactobacillus helveticus on bioactive peptides in low-fat, semi-hard cheese. The austration journal of dairy technology, 58-62.

BADINAND F. (1994). Maîtrise du taux cellulaire du lait. Rec. Méd. Vét., n°170.

BADIS, A., LAOUABDIA-SELLAMI, N., GUETARNI, D., KIHAL, M et OUZROUT, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.

BENGOUMI M., FAYE B. et TRESSOL J-C. (1994) : Composition minérale du lait de vache.

BEUVIER E., BUCHIN S.(2004). Raw milk cheeses in «Chemistry, physics and microbiology, Volume 1». Sous la dir. de Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan et Timothy P. Guinée, p. 287-317. Third edition. Academic Press.

BEUVIER E., BUCHIN S.(2004). Raw milk cheeses in «Chemistry, physics and microbiology, Volume 1». Sous la dir. de Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy

M.Cogan et Timothy P. Guinée, p. 287-317. Third edition. Academic Press.

BEUVIER, E., FEUTRY, F., 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. <http://www.pole-fromager-aoc-mc.org/doc/Basesmicrobiologie.pdf>

BOUTON, Y., GUYOT, P., BEUVIER, E., TAILLIEZ, P., GRAPPIN, R., 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. International Journal of Food Microbiology 76, 27-38.

BOUTROU R, GUEGUEN M (2005) Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. Int J Food Microbiol 102: 1-20.

BÜETIKOFER U., MEYER J., SIEBER R., WECHSLER D., « Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses », *International Dairy Journal*, vol. 17, 2007, p. 968-975.

BUIST, G., VENEMA, G., KOK, J. (1998). Autolysis of *Lactococcus lactis* influenced by proteolysis. Journal of biotechnology. N° 22: 5974-5953.

BYLUND G., (1995) Dairy processing handbook-Tetra pak processing systems AB S-221 86, Lund, Sweden : 18- 23-381(436 pages).

CARIDI, A., MICARI, P., CAPARRA, P., CUFARI, A., SARULLO, V., 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* 13, 191-200

CAYOT P. ET LORIENT D. (1998). Structures et Technofonctions des Protéines du Lait. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris

chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers",
CHANG O.K, K.-H. SEOL , S.-G. JEONG , M.-H. OH , B.-Y. PARK ,C. PERRIN , AND J.-S. HAM Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KaCC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. Faculté des Sciences et techniques, Université de lorraine, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France 2013 p5544-5555.
chemistry.

CHILLIARD Y. et LAMBET G., (1987). Action enzymatique. 2-1- La lipolyse. Dans le lait matière première de l'industrie laitière. Cepid. pp 241.

CHOISY C. ; DESMAZEAUD M; GRIPON J.C .LAMBERET G.LENOIR J .et TOURNEUR C. (1984). Les phénomènes microbiologiques et la biochimie de l'affinage ; in : « Le Fromage ». Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

CIPCLait Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles (2011). Avis relatif à la définition et aux méthodes d'analyse de l'acidité du lait n°2011-02

COIFFIER, O., 1992. Les bactéries coliformes. In : les groupes microbiens d'intérêts laitiers CEPIL (ed), Paris, 303-323.

COULON J-B. ET HODEN A. (1991). Maîtrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA Prod. Anim., 4 (5).pp: 361-367.

COURROYE M., (1987). L'indice d'affinage. Un nouveau moyen de suivre la protéolyse des fromages à pâte cuite par cryoscopie. Les IAA, mars, 169-173.

CREMOUX, R., BARRAL, J., BEUVIER, E., CALLON, C., GILBERT, F., MONTEL, M.C., RAYNAL-LJUTOVAC, K., 2008. Caractérisation et entérotoxicité des souches de *S.aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation. Institut de l'Elevage, Paris. Compte rendu N° 150838016, 238 pages

CUQ J.L. (2007). Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp : 20-25.

DEBRY G. (2001). Lait, nutrition et santé. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris

DEMARIGNY Y, BERGER C, DESMASURES N, GUEGUEN M, SPINLER HE (2000). Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. J Dairy Res 67: 371-380.

DEMARIGNY, Y., BEUVIER, E., BUCHIN, S., POCHET, S., GRAPPIN, R., 1997. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses .2. Biochemical and sensory characteristics. Lait 77, 151-167.

DESMASURES, N., OPPORTUNE, W., GUEGUEN, M., 1997b. *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. International Dairy Journal 7, 643-646.

DILEK DEMIRBÜKER KAVAK1, BILGE AKDENIZ2 Potential Application of Casein for the Inhibition of β -Glucuronidase Activity 1,2 Afyon Kocatepe University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Afyonkarahisar, 2016.

DILLION J.C et BERTHIER AM., (1997). Le fromage dans l'alimentation. In : *Le fromage de la science à l'assurance qualité*, 3ème édition, Paris, PP. 713-724.

DORTU, C., THONART, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 143-154.

DR.SANTOSH KUMAR, DR .U.V.S TEOTIA, DR. ASHWANI SANGHI. Anti oxydative propriety of cow milk caseinates hydrolyzed with different proteases. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. Int J Pharm Pharm Sci, Vol 5, Suppl 2, 418-422 2013

ECK A. (1990). Le Fromage. Technique et documentation, 2eme Ed., Lavoisier, Paris.

ECK A et GILLIS J.C. (2006). Le Fromage. Techniques et documentation, 3^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

FOX P.F., LAW J., MCSWEENEY P.L.H. et WALLACE J., (1993). Biochemistry of cheese ripening. Pp. 389-438. In Cheese: Chemistry, physics and microbiology, volume I, General aspects, second edition. (Ed. P.F. FOX), Springer-Science+Business Media, B.V., 601p.

FOX P.F., SNIGH T.R. and SWENEY M.C., 1994. Proteolysis in cheese during

GEORGALAKI, M.D., PAPADELLI, M., ANASTASIOU, R., KALANTZOPOULOS, G.,

TSAKALIDOU, E. (2002). Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. Lait, 82, 657-671.

GILLIS J.-C., (1997). Définition du fromage et normalisation. In : *Le fromage de la science à l'assurance qualité*, 3ème édition, Paris, PP. 846-849.

GOERGES S., MOUNIER J., REA M C., GEL SOMINO R., HEISSEV., BEDUHN R., COGAN T M., VANCANNEYT M. and SCHERER S., (2008). Commercial ripening starters microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south German red smear cheese. *Applied and environmental microbiology*. 74, 2210-2217.

GOURSAUD J., (1985). Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F.M.. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

GOY D., HÄNI JP. , WECHSLER D. et JAKOB E. (2005). Valeur de la teneur en caséine du lait de fromagerie. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions Gruyère N°27f.

GUEGEN L., (1979). *Cach. Nutr. Diét.*, 14, 213-217.

GUESSAS B., HADADJI M., SAIDI N. ET KIHAIL M. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.

HAYALOGLU, A.A., ET KIRBAG, S. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kufllu cheese. *International journal of food microbiology* 115, 376-380.

IMRAN IRSHAD & ARA KANEKANIAN & ADRIAN PETERS & TARIQ MASUD
Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions
Association of Food Scientists & Technologists (India) 2013

JEAN C., et DIJON C., (1993) Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P. et BRULE G., (2008)
Les produits laitiers ,2^{ème} édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages).

JOLLIVET N, BELIN J-M, VAYSSIER Y (1993) Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* Thom. *J Dairy Sci* 76: 1837-1844.

KAMOUN M. (1995) : Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la
KAWAI Y., TADOKORO K., KONOMORI R., ITOH K. , SAITO T., KITAZAWA H., et ITOH T., 1999. A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stage of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* .*J. Dairy sci* .82 :481-485.

KLOOS, W.E., WOLFSHOHL, J.F., 1991. *Staphylococcus-cohnii* subspecies - *Staphylococcus-cohnii* subsp *cohnii* subsp-nov and *Staphylococcus-cohnii* subsp *urealyticum* subsp-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 284-289.

KORHONEN H AND PIHLANTO A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 2006; 16:945-960

KULLISAR T., SONGISEPP E., MIKELSAAR M., ZILMER K., VHIHALEMM T., ZILMER M. (2003). Antioxidative LAB fermented goat's milk decrease oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Brit. J. Nutr* , 90(2) : 449-45.

KUNENE N.F., GEORNARAS I., VON HOLY A. et HASTINGS J.W. (2000).

Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid Bacteria From a sorghum-based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Protein and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Appl environ microbial*, 66 (3), 1084-1092.

LAHOV E, and REGELSON W., (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk : caseicidin, isracidin peptides. *food chem. Toxicol.*, 34 :131-145.

LAMPRELL, H., 2003. Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne. 190p

LARPENT J.P. (1997). Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Les levures. Technique et documentation Lavoisier. Paris.

LARSEN MD, KRISTIANSEN KR, HANSEN TK (1998). Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 43: 215-221.

LE MINOR L. et RICHARD C. (1993). Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur.

LECLERCQ-PERLAT MN, BUONO F, LAMBERT D, LATRILLE E, SPINLER HE. (2004). Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *J Dairy Res* 71: 346-354.

LEGRAET Y, LEPIENNE A, BRULE G, DUCRUET P (1983). Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Lait* 63: 317-332.

LENOIR, J., LAMBERET, G., SCHMIDT, J.L., 1983. L'élaboration d'un fromage : l'exemple du camembert. *Pour La Science* 69, 30-42.

LEYRAL G. ET VIERLING É. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4^e édition Biosciences et techniques. 87p.

local : études, microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'i
LUQUET F M. (1999). Lait et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome II, technique et documentation , 2eme Edition, Lavoisier, paris.

MAHAUT M., JEANTET R. ET BRULE G. (2000). Initiation à la technologie fromagère. Technique et documentation de Lavoisier , paris.

MAHAUT M., JEANTET R. ET BRULE G. (2003). Initiation à la technologie fromagère. Technique et documentation de Lavoisier , paris.

MALLET, A., GUEGUEN, M., DESMASURES, N., 2010. Etat des lieux de la diversité microbienne quantitative et qualitative de laits crus normands destinés à la transformation fromagère. 8ème Congrès National de la SFM, 2-4 juin 2010, Marseille.

MATHIEU J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris.

Mc SWEENEY P.L.H. and SOUSA M.J., 2000 Biochemical pathways for the 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie324

Mc SWEENEY P.L. H. , 2004; Biochemistry of cheese ripening. Vol 57, No 2/3 , *Int. J. MEISEL H., GOEPFERT A., GÜNTHER S.* « ACE-inhibitory activities in milk products », *Milchwissenschaft*, vol. 52, 1997, p. 307-311.

MEYER C. ET DENIS J.P (1999). Elevage de la vache laitière en zone tropicale. Edition Quae, CTA, presses agronomiques de Gembloux.

MICHEL, V., HAUWUY, A., CHAMBA, J.F., 2001. Raw cowmilk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait* 81, 575-592.

MICHEL, V., VERDIER-METZ, I., DELBES, C., CHAMBA, J.F et MONTEL, M.C. (2005). Diversité microbienne des laits crus: quels enjeux, quels risques, quels moyens de gestion ? Colloque INRA-INAO Novembre 2005.

MIETTON, B., DESMAZEAUD, M., DE ROISSART, H., WEBER, F., 1994. Transformation du lait en fromage, Chap. IV-3, Loriga (Ed), 55-133.

MIETTON B. (1995). Incidence de la composition des fromages au démoulage et des paramètres d'environnement sur l'activité des agents de l'affinage. *Revue des ENIL*, 189, 19-27.

MOLIMARD P., SPINLER HE. (1996). Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J Dairy Sci* 79: 169-184. 20.

MORGAN, F., MASSOURAS, T., BARBOSA, M., ROSEIRO, L., RAVASCO, F., KANDARAKIS, I., BONNIN, V., FISTAKORIS, M., ANIFANTAKIS, E., JAUBERT, G., RAYNAL-LJUTOVAC, K., 2003. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research* 47, 39-49.

NGUYEN- THI PHUONG NGUYEN-THI, MAY-FARAH MISSAOUI, ISABELLE ADT, ZOLALAINA RAKOTOARISOA, PASCAL DEGRAEVE, CORALIE DUPAS, LAURA LIGNITTO, ENRICO NOVELLI, SEVERINO SEGATO, DONG PHAN THE, & NADIA OULAHAL, Présence de composés inhibant la croissance de *Listeria innocua* dans un fromage italien, l'Asiago d'allevio.

NOONPAKDEE W., SANTIVARANGKNA C., JUMERIANGRIT P., SONOMOTO K., ET PANYIM S. (2003). isolation of nisin-producing lactococcus lactis WNS 20 strain from nham, traditional thai fermented sausage. *Int. J. Food microbiolo.* 81: 137-145.
ntérêt bio-préservateurThèse de Doctorat. Université d'Oran. 216 pp.
of Dairy Technol , 127-144.

OGUNBANWO, S.T., SANNI, A.L., OMILUDE, A.A., (2003). Characterization of lactobacilli in cheese. *Journal of dairy research*, 25, 431-438.

PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., KOTZEKIDOU, P., (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65,859– 867.

PELAEZ C. et REQUENA T., (2005). Exploiting the potentiel of Bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15, 831-844.

physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation.thèse de doctorat en
PIARD J.C. ET DESMAZEAND M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71: 525-541
POUGHEON S.et GOURSAUD J., (2001) Le lait caractéristiques physicochimiques In **DEBRY G.,** Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages).

PRITCHARD S. R., PHILLIPS M., KAILASAPATHY K., « Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese », *Food Research International*, vol. 43, 2010, p. 1545-1548.

production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 293–
RAMET J.P. (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection FAO Alimentation et nutrition n°48.

RECICO et al. Casein hydrolysate as a source of antimicrobial, antioxidant and ACE peptide. *Lait* 2007; 87:241-249

ripening. In : *Biochemistry of milk products.* (ed. FOX P.F.) p. 1-31, The Royal Society of
RIZZELLO C. G., LOSITO I., GOBBETTI M., CARBONARA T., DE BARI M. D., ZAMBRONIN P. G., « Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties », *Journal of Dairy Science*, vol. 88, 2005, p. 2348-2360.

ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M.C., JANSSENS, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries Lactiques* (Tome I), Lorica (ed), 25-70.

ROUTAUT H. et LEFRANCQ E. (2005). Alimentation théorique. Edition Sciences des Aliments.

SAIDI NOUREDDINE. 2007. La microflore lactique du lait cru de chèvre

SAIGA AI, TANABE S, NISHIMURA T, 2003 antioxydant activity of peptides obtained by protease traitement .*J. Agric.food chem.* 51, 3661-3667.

SAITO T., NAKAMURA T., KITAZAWA H., KAWAI Y., ITOH T., « Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese », *Journal of Dairy Science*, vol. 83, 2000, p. 1434-1440.

SCHMIDT D.G., 1980. Association of caseins and casein micelle structure. In developments in dairy chemistry - 1- Proteins (Coord. FOX P.F.) A.S.Publishers, pp. 61-86, 410 p. Sciences Agronomiques université INA ELHarrach-Alger.

SERHAN M., 2008. Valorisation durable des laits de chèvre de la région du nord liban. Transformation en fromage Darfiyeh et établissement de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine. *Thèse de doctorat.* Institut National polytechnique de lorraine, 1991.

SHILPA VIJ , PRIANKA CHANDRA, AND PRASHANT RAMRAO BACHANTI.

Antimicrobial activity of casein fermentate of probiotic lactobacillus spp. Dairy microbiology division, national dairy research institute, Karnal, India (2014). p202-208.

SIBOUKEUR O .K., (2007): Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques
SPINNLER H.E, GHICHARD E. et GRIPON J-C., (1997). Les propriétés physiques et organoleptiques du fromage. 2. La flaveur des fromages. Pp. 493-508. In le fromage, de la science à l'assurance qualité. (Coord. A. ECK et J.C. GUILKLIS), 3^{ème} Ed. Tec et Doc. Lavoisier, 891p

TAKAHASHI, T., SATOH, I., KIKUCHI, N., 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 725-728

TORMO, H., ALI HAIMOUD - LEKHAL, D., LAITHIER, C., 2006. Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage.13ème Rencontre Recherche Ruminants. Institut de l'Elevage-INRA, 305-308.

TOUREAU V., BAGIEU V. et LE BASTARD A-M. (2004). Une priorité pour la recherche :la qualité de nos aliments.Les recherches sur la qualité du fromage. INRA mission communication. *Option Médit.*, **13**, 81-103

VAN DEN TEMPEL T., NIELSEN MS. (2000). Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. Int J Food Microbiol 57: 193-199.

VEISSEYRE R. (1975).Technologie du lait.3^{ème} Ed, Maison Rustique, Paris.

VEISSEYRE R. (1979). Technologie du lait constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3^{ème} édition. Edition la maison rustique, Paris.

VIGNOLA C.L., (2002) Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN: 29-34 (600 pages).

WALTHER B. (2006). Peptides Bioactifs Dans Les Lait Et Les PRODUITS Laitiers.Station de recherche Agroscope Lieberfeld-Posieux ALP, Bern peptide.

WASILJIVIC T., SHAH N.P. and JELEN P., 2005 Growth characteristics of *lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 as affected by different neutralralizers. Aust . J. Dairy thechnol. 60: 3-9.

ZUCHT H.D., RAID A M., ADERMANN K., MAGERT H.J., AND FORSSMAN W.G. (1995). Casocidin-I:A casein alphaS2 derived peptide exhibits antibacterial activity. FEBS Letters, 372:185-188.

Annexes



Anexe1 : techniques de dilutions

❖ Pour le lait

La suspension mère est le lait lui-même

Délutions décimales

-Introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1ml de la suspension mère, dans un tube à vis stérile contenant préalablement 9 ml d'eau physiologique, cette dilutions est alors la 10^{-1} .

-introduire par la suite 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tubes à vis stérile contenant 9ml du même diluant, cette dilution est ma 10^{-2} .

-introduire ensuite 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube à vis stérile contenant 9ml de l'eau physiologique, cette dilution étant la dilution 10^{-3} .

❖ Pour le fromage

-introduire 10g de fromages à analyser dans un flacon contenant 90ml d'eau physiologiques stérile, homogénéiser pendant 3 minutes, cette suspension constitue alors la dilution 10^{-1} .

Délutions décimales

-introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1ml du la suspension mère dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9ml d'eau physiologique, cette dilution est la 10^{-2} , et ce jusqu'à la dilution 10^{-7} .

Annexe 2 : dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FTAM)

❖ Mode opératoire

-faire fendre la gélose PCA au bain mari et maintenir ca température à 45-46°C ;

-A partir des dilutions décimales introduire 1ml dans les boites de pétri ;

-couler la gélose préalablement fondu environ 15 ml du milieu, et bien homogénéiser en faisant des mouvements de huit ;

-après refroidissement et gélification du milieu PCA, les boites seront incubé à l'envers dans l'étuve à 37°C pendant 72 heures ;

-dénombrement des boites contenant les colonies développées quelque soit leurs tailles et dont le nombre est compris entre 30 et 300.

-multiplier le nombre trouver par l'inverse de dilutions afin d'avoir le nombre de germes par gramme/millilitre de fromage.

Annexe 3 : dénombrement des levures et moisissures

On utilise comme milieu de culture (Oxytétracycline Glucose Agar) OGA, ce dernier favorise la croissance des levures et moisissures et inhibe la prolifération des autres bactéries.

❖ Mode opératoire

- faire fendre la gélose OGA et la maintenir à 45-46°C
- Prendre 1ml de la suspension mère et 1ml de chaque dilution décimales et ensemencer les boîtes de pétri préparés.
- couler la gélose fondue sur les boîtes de pétrie et bien homogénéiser ;
- Après solidification de la gélose, l'incubation se fait pendant 5 jours à température ambiante environ 25°C.
- Pour la lecture on s'intéresse aux boîtes ayant de 30 à 300 colonies, les résultats obtenue multiplier par l'inverse de dilutions.

Annexe 4: dénombrement de la flore lactique

✓ *Lactobacillus bulagaricus*

L'ensemencement se fait en masse et en double couche, le milieu de culture étant le MRS.

❖ Mode opératoire

- faire fendre la gélose MRS à 100°C et la maintenir à 45-46°C ;
 - portées 1ml de chaque dilutions dans les boîtes de pétrie ;
 - couler la gélose MRS environ 15 ml et bien homogénéiser en effectuant des mouvements de huit ;
- Après solidification du milieu en ajoute une deuxième couche de gélose afin de créer l'anaérobiose ;
- l'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 72h pour les mésophiles et à 44°C pendant 72h pour les thermophiles.

✓ *Streptococcus lactiques*

L'ensemencement se fait en masse et en double couche, le milieu de culture étant M17

❖ Mode opératoire

- faire fendre la géloseM17 à 100°C et la maintenir à 45-46°C ;
- portées 1ml de chaque dilutions dans les boîtes de pétrie ;
- couler la gélose M17 environ 15 ml et bien homogénéiser en effectuant des mouvements de huit ;

Après solidification du milieu en ajoute une deuxième couche de gélose afin de créer l'anaérobiose ;

-l'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 72h pour les mésophiles et à 44°C pendant 72h pour les thermophiles.

- La lecture consiste à compter les bactéries lactiques qui poussent en profondeur en formant de petites colonies blanches et lenticulaires.

Annexe 5 : dénombrement des coliformes totaux

❖ Mode opératoire

-faire fendre la gélose VRBL à 100°C et la maintenir à 45-46 °C

-préparer une série de deux boites pour chaque dilution ; ensemercer les boites avec 1ml de chaque dilutions décimales ;

-couler les boitesensemencées avec la gélose VRBL environ 15 ml, bien homogénéisé en effectuent des mouvements circulaires et laisser refroidir.

-une fois la gélose refroidie, ajouter une deuxième couche de gélose VRBL pour assurer l'anaérobiose ;

-incuber les boites retournées à 37°C pendant 24heures ;

-compter les colonies violettes en tenant compte des boites ayant 30à 300 colonies (GUIRAUD, 2003).

Annexe 6 : dénombrement des coliformes fécaux

❖ Mode opératoire

-faire fendre la gélose VRBL à 100°C puis la maintenir à 45-46°C ;

-porter 1ml de chaque dilutions dans les boites de pétries ;

-couler la gélose dans les boites de pétries environ 15ml, bien homogénéiser ;

-une la gélose refroidie ajouter une deuxième couche de VRBL afin d'assurer l'anaérobiose.

-l'incubation se fait à 44°C pendant 24heures ;

-la lecture consiste à dénombrer les colonies violacées d'un diamètre 1mm environ.

Annexe 7 : recherche de *staphylococcus aureus*

La recherche de *staphylococcus aureus* se fait en deux étapes :

➤ L'enrichissement

Introduire 1ml du lait ou bien de la suspension mère dans le cas du camembert dans 15ml de GC, après homogénéisation par une simple agitation, l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. Les tubes ayant une modification de la couleur vire au noir sont considérées comme positif.

➤ L'isolement

Concerne juste les tubes positifs et on procède comme suit :

- En premier lieu couler la gélose Chapman préalablement fondu sur boîtes de pétrie, laisser solidifier ;
- une fois la gélose est solide,ensemencer en surface 0.1ml de la solution du tube positif ;
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures ;
- l'apparition de colonies jaunes est indicateur de présence de *staphylococcus aureus*.

Annexe 8 : Protocol de test de catalase

- préparer une lame dégraissée avec de l'éthanol et stérile ;
- Déposer 2à3 gouttes d'eau oxygénée à 10 volume sur la lame ;
- à l'aide d'une pipette stérile prélevé quelque cellules de la colonie ;
- Mélanger soigneusement les cellules avec de l'eau oxygénée ;
- Dégagement de gaz signifie que la souche est catalase +, l'absence du gaz signifie que la souche est catalase (LEVEAU et al, 1991).

Annexe 9 : test de coagulase confirmatif de la présence de *staphylococcus aureus*

- prélever les cellules suspectées d'être *Staphylococcus aureus* ;
- introduire les cellules prélevées dans un tube contenant un bouillon nutritif ;
- incubation à 37°C pendant 24 heures ;
 - Juste après la fin de la durée d'incubation, prendre 0,5ml de milieu d'enrichissement + 0,5ml de plasma du lapin ;
- encore une fois le tout est incubé à 37°C pendant 24 heures.

La coagulation du plasma nous confirme qu'il s'agit de germe recherché.

Annexe 10 : La mesure de la densité du lait

1. On verse lentement l'échantillon du lait dans une éprouvette en évitant la formation de la mousse (sur la paroi)
2. On introduit le thermo lactodensimètre dans l'éprouvette et après stabilisation de celui-ci on effectue la lecture
3. En effectue la correction de la densité selon la température de l'échantillon somme suit :
$$\text{Densité} = \text{densité (lue)} + 0.2 (20 - \text{température lue}) \text{ si } T^{\circ}\text{C} > 20^{\circ}\text{C}$$
$$\text{Densité} = \text{densité (lue)} - 0.2 (20 - \text{température lue}) \text{ si } T^{\circ}\text{C} < 20^{\circ}\text{C}$$

Annexe 11 : Détermination de l'acidité en °Dornic

❖ Principe

L'acidité du lait est exprimée conventionnellement en degré DORNIC. Un degré dornic est équivalent à une teneur de 0.1 g d'acide lactique par litre de lait.

L'acidité d'un lait frais normal après la traite varie de 15 à 17° dornic ; une augmentation de cette valeur montre une acidification du lait provenant de l'action de ferments lactiques produisant de l'acide lactique à partir de lactose.

❖ Protocole

1. Placer la solution de NaOH au 1/9ème Mol.L dans la burette
2. Ajuster la burette à zéro
3. Dans un bécher contenant 10ml de lait, ajouter 3 à 4 gouttes de phénophtaléine (à 1%)
4. Verser doucement la solution de NaOH jusqu'à apparition d'une coloration rose persistant plus de 30s relever le volume verser (noté V en ml)
Calculer la valeur de l'acidité en °dornic selon la formule suivante :
$$A^{\circ}\text{D} = 10 \times V \text{ (ml)}.$$

Annexe 12 : Méthode de dosage de la matière grasse dans le fromage selon la méthode de GERBER

1. Placer le bécher troué (se trouve collé dans le bouchon du butyromètre) sur une balance puis tarer la balance ;
2. Peser une prise d'essai de 3g ;
3. Placer le bécher dans le butyromètre spécifique pour le fromage ;
4. Verser à l'aide d'une pipette 15ml d'acide sulfurique (densité de 1.52) jusqu'à l'immersion totale de la prise d'essai ;
5. Fermer l'ouverture de remplissage ;
6. Mettre le butyromètre à l'échelle vers le haut au bain marie à 70-80°C et agiter à plusieurs reprises jusqu'à la dissolution complète du fromage ;
7. Retirer du bain marie et ajouter par l'ouverture de l'échelle 1ml d'alcool iso amylique puis compléter par l'acide sulfurique jusqu'à la marque des 15% de l'échelle ;
8. Agiter et replacer au bain-marie à 65°C pendant 5min ;
9. Centrifuger pendant 5min ;
10. Replacer au bain marie 65°C pendant 5min et régler la colonne des lipides au point zéro et lire le taux des lipides à l'extrémité inférieure du ménisque.

Annexe 13 : Méthodes de détermination de l'extrait sec totale dans le lait et le fromage :

- 1-Allumer le dessiccateur.
- 2-Mettre sur la balance de dessiccateur une capsule sèche et tarer.
- 3-Peser 3g du lait et 5g du fromage.
- 4-Etaler la prise d'essai au maximum pour accélérer la dessiccation.
- 5-Fermer l'appareil et laisser le temps de dessiccation.
- 6-la valeur s'affiche sur l'écran de l'appareil exprimé en pourcentage.

Annexe 14 : Recherches des résidus d'antibiotiques dans le lait :

- 1-Mettre en marche l'incubateur et le laisser stabiliser à 45.7°C.
- 2-Retirer les flacons à réactifs et les tiges de réfrigérateur 15mn avant utilisation.
- 3-Prélever 0.1 à 0.2ml de lait mélangé préalablement et les déposer dans le flacon à récepteur.
- 5-mettre le flacon dans l'incubateur et incubé pendant 3 minutes.
- 6-prendre une tige et la disposer dans le flacon à tige, vérifier à ce que les flèches de la tige soient orientées vers le bas dans le flacon
- 7-Poursuivre l'incubation
- 8-2mn après l'incubation de la tige dans le flacon retirer la tige
- 9-interpréter visuellement les résultats.

Annexe 15 : Détermination de la teneur en protéine par la méthode de Bradford 1976.

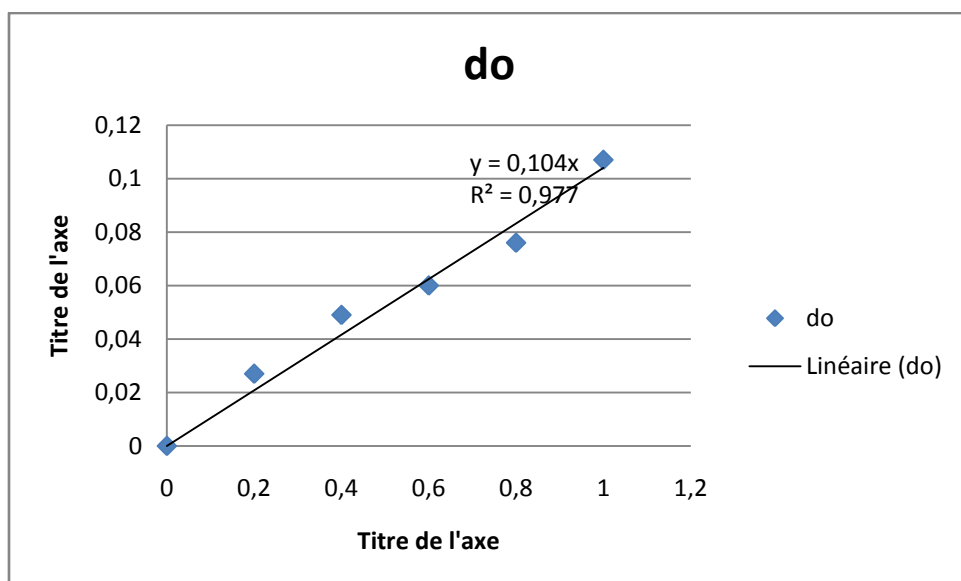
Nous avons utilisé le réactif BRADFORD B 6916 SIGMA Life Science.

1. A partir de la solution mère de BSA 2mg/ml on prépare des séries de solutions filles 0,1mg/ml;
2. Dans des tubes à essai on prélève 0.1ml DE l'échantillon et on ajoute 1ml du réactif de BRADFORD, vortexé puis mettre à l'obscurité pendant 5 à 10minutes ;
3. Lire la DO à 595 nm.

La BSA est utilisée comme protéine étalon pour le tracé de la courbe $DO=f(C)$

A partir de la solution mère de BSA, des solutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

	1	2	3	4	5	6
BSA μl	0	20	40	60	80	100
ED μl	100	80	60	40	20	0
Réactif ml	1	1	1	1	1	1



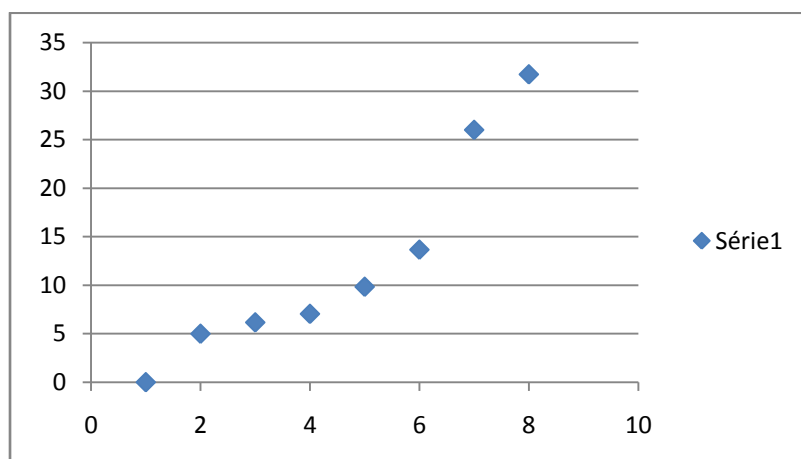
Annexe 16 : Test de piégeage du radical libre DPPH.

- ❖ Préparation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique (vitamine C) de 0.0125 à 5 mg/ml.
- 50ml de l'échantillon + 1.95 ml de la solution méthanolique DPPH ;
- 50ml du méthanol + 1.95 ml de la solution méthanolique DPPH (blanc) ;
- Incubation 30min à l'obscurité à T° ambiante ;
- Lecture à 515 nm.

$$I\% = (A \text{ contrôle} - A \text{ test}) / (A \text{ contrôle} \times 100)$$

Blanc=0.681

concentration	0.125	0.5	0.75	1	2	4	5
Do	0.647	0.699	0.633	0.614	0.588	0.504	0.465
%	4.99	6.16	7.04	9.83	3.65	25.99	31.71



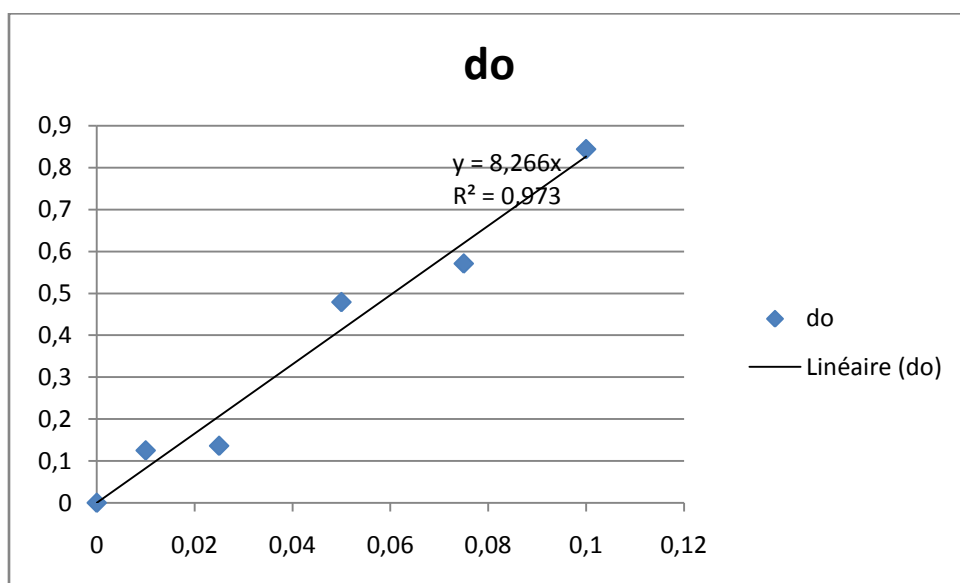
Annexe 17 : Test de réduction de fer FRAP.

- ❖ Préparation des différentes concentrations de l'extrait de 0.007 à 2.5 mg/ml.
- 1 ml de l'échantillon de chaque concentration +ml Tampon phosphate 0.2 M (pH=6.6)+1 ml K_3Fe (Ferrocyanide de potassium) 61% ;
- Incubation au bain marie (50°) pendant 20 min ;
- Ajout de 1 ml d'acide trichloracétique (10%) ;
- Centrifugation des tubes à 300\10 min ;
- 1ml de surnageant+1 ml de l'eau distillée+200 μ l de $Fe Cl_3$ à 0.1% ;
- Incubation 10 min à l'obscurité ;
- Lecture à 700 nm.

Blanc même que l'échantillon avec l'eau distillé.

concentration	0	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1
Do	0	0.125	0.136	0.479	0.571	0.844

- ✓ phosphate mono-potassique : A 0.5 g dans 50ml d'eau.
- ✓ phosphate di-sodique : B 0.29675g dans 25ml d'eau.
- ✓ Tampon phosphate : 26.6 ml A+23.4 ml B.
- ✓ Chlorure de fer 0.025 g dans 25ml.
- ✓ TCA 10% 0.5g dans 50ml d'eau.
- ✓ Ferrocyanide de potassium 0.5g dans 50 ml.



Annexe 18 : Composition des milieux de cultures

• GELOSE POUR DENOMBREMENT (PCA)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,5 g
- Glucose.....	1,0 g
- Agar agar bactériologique.....	12,0 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

• Géllose VRBL

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande	7,0 g
- Extrait autolytique de levure	3,0 g
- Lactose	10,0 g
- Sels biliaires.....	1,5 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Rouge neutre	30,0 mg
- Cristal violet	2,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	12,0 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

• Bouillon M 17

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	2,50 g
- Peptone pepsique de viande	2,50 g
- Peptone papainique de soja	5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
- Extrait de viande	5,00 g
- Lactose	5,00 g
- Glycérophosphate de sodium	19,00 g
- Sulfate de magnésium	0,25 g
- Acide ascorbique	0,50 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,1 \pm 0,2$.

- **Gélose de CHAPMAN**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	5,0 g
- Peptone pepsique de viande	5,0 g
- Extrait de viande	1,0 g
- Mannitol	10,0 g
- Chlorure de sodium	75,0 g
- Rouge de phénol	25,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

- **Gélose glucosée à l'oxytétracycline**

Pour 1,1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure.....	5,0 g
- Glucose.....	20,0 g
- Oxytétracycline.....	0,1 g
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $6,6 \pm 0,2$.

- **Gélose MRS**

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone.....	10,00 g
- Extrait de viande	10,00 g
- Extrait autolytique de levure	5,00 g
- Glucose.....	20,00 g
- Tween 80	1,08 g
- Phosphate dipotassique	2,00 g
- Acétate de sodium	5,00 g
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g
- Sulfate de magnésium	0,20 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g
- Agar agar bactériologique.....	15,00 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $5,7 \pm 0,1$

Annexe 19 : analyse statistique du ph au différent stade d'affinage

	pH J1 Ouacif	pH J5 Ouacif	pH J9 Ouacif
pH J1 Ouacif		0.049669	0.672300
pH J5 Ouacif	0.049669		0.113719
pH J9 Ouacif	0.672300	0.113719	

Annexe 20 : Analyse statistique de l'EST au différent stade d'affinage.

	EST J1 Ouacif	EST J5 Ouacif	EST J9 Ouacif
EST J1 Ouacif		0.000707	0.000275
EST J5 Ouacif	0.000707		0.000303
EST J9 Ouacif	0.000275	0.000303	

Annexe 21 : Analyse statistique de l'ESD au différent stade d'affinage.

	ESD J1 Ouacif	ESD J5 Ouacif	ESD J9 Ouacif
ESD J1 Ouacif		0.013996	0.000773
ESD J5 Ouacif	0.013996		0.004944
ESD J9 Ouacif	0.000773	0.004944	

Annexe 22 : analyse statistique des protéines au différent stade d'affinage.

	protei J1 Ouacif	protei J5 Ouacif	protei J9 Ouacif
protéine J1 Ouacif		0.035449	0.002672
protéine J5 Ouacif	0.035449		0.026120
protéine J9 Ouacif	0.002672	0.026120	

Annexe 23 : analyse statistique comparative de la MG au même stade d'affinage.

	MG J5 fermier	MG J5 Ouacif
MG J5 fermier		0.009404
MG J5 Ouacif	0.009404	

Annexe 24 : analyse statistique comparative de l'ESD au 5^{ème} et 9^{ème} jour d'affinage.

	ESD J5 fermier	ESD J5 Ouacif		ESD J9 fermier	ESD J9 Ouacif
ESD J5 fermier		0.019979	ESD J9 fermier		0.001186
ESD J5 Ouacif	0.019979		ESD J9 Ouacif	0.001186	

Annexe 25 : Analyse statistique comparative des protéines au 5^{ème} et 9^{ème} jour d'affinage.

	protei J5 fermier	protei J5 Ouacif		protei J9 fermier	protei J9 Ouacif
protei J5 fermier		0.022520	protei J9 fermier		0.003799
protei J5 Ouacif	0.022520		protei J9 Ouacif	0.003799	

Annexe 26 : Analyse statistique comparative pour les lactobacilles au long de l'affinage.

	LB à 44°C 9jF	Lb à 44 °C9jW	LB à 37°C 5j 5jw	LB à 37°C 5jw
LB à 44°C 9jF		0.159630	LB à 37°C 5j	0.013291
LB à 44 °C9jW	0.159630		LB à 37°C 5jW	0.013291

Annexe 27 : Analyse statistique comparative pour les streptococcus au 9^{ème} jour d'affinage.

	SL à 37°C 9JF	SL à 37°C 9J W
SL à 37°C 9jF		0.028771
SL à 37°C9jW	0.028771	

Annexe 28 : analyse statistique des deux paramètres DPPH et FRAP entres 1^{er} et 9^{ème} jour d'affinage.

	FRAP w 1j	FRAP w 9j	DPPH w1j	DPPH w 9j
FRAP f 1j		0.007593	dpph w 1j	0.025390
FRAP f 9 j	0.007593		dpph w 9j	0.025390

Annexe 29 : analyse statistique des FTAM au long de l'affinage

	FTAM1j F	FTAM5j F	FTAM9j F
FTAM1j F		0.493844	0.999972
FTAM5j F	0.493844		0.497380
FTAM9j F	0.999972	0.497380	

Annexe 30 : analyse statistique des levures et moisissures au sein du même produit au long d'affinage.

	L&M 1J F	L&m 5j F	L&M 9j F
L&M 1J F		0.356618	0.264194
L&m 5j F	0.356618		0.955534
L&M 9j F	0.264194	0.955534	

Annexe 31 : Résultats de l'analyse microbiologique du fromage « fermier »

1 ^{er} jour d'affinage					
	E1	E2	E3	moyenne	ecarttype
FTAM	6*10 ⁴	1.05*10 ⁵	6.3*10 ⁵	247033.333	335325.071
L&M	4.4*10 ⁴	1.95*10 ⁴	1.23*10 ⁵	62166.6667	54088.6618
LB à 37°C	6*10 ⁴	1.32*10 ⁵	1.31*10 ⁵	68733.3333	60375.6021
LB à 44°C	2.02*10 ³	1.1*10 ³	4.9*10 ²	1203.33333	770.21642
SL à 37°C	2.13*10 ⁶	1.32*10 ⁶	2.3*10 ⁶	1916666.67	523672.926
SL à 44°C	1.8*10 ³	3*10 ⁴	1.5*10 ²	61600	78129.8918

5 ^{ème} jour d'affinage					
	E1	E2	E3	moyenne	ecarttype
FTAM	1.24*10 ⁴	1.63*10 ⁶	2.34*10 ⁶	1327466.67	1192927.18
L&M	1.27*10 ⁴	6.3*10 ⁴	4.9*10 ⁴	188566.667	262257.628
LB à 37°C	1.87*10 ⁵	2.63*10 ⁴	2.45*10 ⁶	231666.667	39715.656
LB à 44°C	4.2*10 ³	5.3.10*5	3*10 ⁴	1178066.67	1599592.83
SL à 37°C	7.2*10 ³	3*10 ⁶	3*10 ⁶	2010000	1714730.3
SL à 44°C	2.9*10 ³	5.3*10 ⁴	19000	26400	23779.8234

9 ^{ème} jour d'affinage					
	E1	E2	E3	moyenne	ecarttype
FTAM	3.3*10 ⁵	5.2*10 ⁴	8.6*10 ⁵	314666.667	472378.379

L&M	2.24*10 ⁵	3.7*10 ²	2.96*10 ⁶	1061345.67	1648091.64
LB à 37°C	6.3*10 ³	5.5*10 ⁵	6*10 ⁴	205433.333	299609.017
LB à 44°C	5.6*10 ²	3.08*10 ³	4.2*10 ²	1169666.67	1496.97473
SL à 37°C	3.9*10 ⁴	4.7*10 ⁵	3.*10 ⁶	1169666.67	1599696.95
SL à 44°C	5.2*10 ³	3.12*10 ³	3*10 ⁴	2869440	4962810.65

Annexe 31 : Résultats d'analyse microbiologique du fromage « Saint amour ».

1er jour d'affinage					
	E1	E2	E3	moyenne	ecartype
CT	9.10* ⁶	3.10* ⁴	4.10* ³	3011333.33	5186353.76
CF		42	30	5	25.6666667
SF		63	35	10	36
L&M	41,8.10* ⁴	1,2.10* ⁷	1,6.10* ⁶	4672666.67	6373118.65
Lbà 37°C	1,02.10* ⁷	3.6.10* ⁷	2.10* ⁷	22066666.7	13023568.4
Lbà 44°C	1,1.10* ⁵	2.10* ⁴	6.10* ³	45333.3333	56438.7574
SL à 37°C	3,7.10* ⁶	2.10* ⁷	2,1.10* ⁷	14900000	9712363.26
SL à 44°C	3.10* ³	10* ⁴	5.10* ⁵	171000	284943.854
FTAM	1,9.10* ⁵	9.10* ⁵	10* ⁷	3696666.67	5470377.81

9ème jours d'affinage					
E1	E2	E3	moyenne	ecartype	
1,4.10* ⁶	10* ⁴	5.10* ⁴	486666.667	791222.683	
	31	38	31	33.3333333	4.04145188
	62	23	40	41.6666667	19.5533458
3,7.10* ⁴	1,7.10* ⁷	9.10* ⁵	5979000	9554214.93	
3,8.10* ⁶	1,4.10* ⁷	1,7.10* ⁷	11600000	6919537.56	
1,6.10* ⁴	2,6.10* ⁴	2,4.10* ³	14800	11845.6743	
4,6.10* ⁶	9.10* ⁶	10* ⁷	7866666.67	2872861.52	
2.510* ³	2.10* ⁴	2,2.10* ⁵	80833.3333	120839.08	
1,45.10* ⁵	1.10*10* ⁷	7,2.10* ⁷	27715000	38734076.4	

5ème jour d'affinage					
E1	E2	E3	moyenne	ecartype	
10* ⁶	8.10* ⁴	2.10* ³	360666.667	555050.748	
	21	22	20	21	1
	52	32	20	34.6666667	16.1658075
2,6.10* ⁴	4,3.10* ⁷	2.10* ⁶	15008666.7	24261290.7	
2,2.10* ⁷	2,9.10* ⁷	3,3.10* ⁷	28000000	5567764.36	
1.10* ⁴	6.10* ⁴	2.10* ³	24000	31432.4673	
9.10* ⁶	4,1.10* ⁷	1,2.10* ⁷	20666666.7	17672954.9	
5.10* ⁴	10* ⁵	4.10* ⁵	183333.333	189296.945	
1,2.10* ⁵	4.10* ⁷	2.10* ⁷	20040000	19940030.1	