République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri De TIZI OUZOU

Faculté Des Sciences Biologiques Et Des Sciences Agronomiques

Département De Biochimie-Microbiologie

Mémoire De Fin D'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science de la nature et de la vie
Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Evolution de la lipolyse et protéolyse et recherche d'activité anti-oxydante au cours de l'affinage des fromages à pate mole type camembert

Présenté par : **M^{elle}. HALZOUN FATIHA**

Devant le jury composé de :

Promoteur : **M^{r}. SEBBANE HILLAL., Maitre assistant classe A**

COPROMOTEUR : M^{elle}. KROUR SOUAD., Responsable du laboratoire

PRESIDENT : M^{me} IRATNI GHENIMA., Maitre assistante classe A

Examinatrice 1 : M^{me} SENOUSSI CHAHRA., Maitre assistante classe A

Examinatrice 2: M^{me} SI AHMED SALIHA., Maitre assistante classe A

Promotion : 2014/2015

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour tous ceux qui m'ont aidée à la réalisation de ce manuscrit, qu'ils trouvent ici mon estime, ma sympathie ainsi que mes vifs remerciements.

En premier lieu, j'exprime mes remerciement et ma gratitude à monsieur SEBBANE H, pour avoir encadré cette étude et de m'avoir guidée avec ses précieux conseils et orientations, de m'avoir permis d'enrichir mes connaissances.

Je tiens à remercier M^elle KROUR pour m'avoir aidée dans la réalisation de ce mémoire et de m'avoir permis de réaliser cette étude expérimentale au sein de l'unité STLD de Tizi-Ouzou.

Mes remerciements les plus sincères vont également à tout le personnel de la laiterie-fromagerie STLD de Tizi-Ouzou de m'avoir permis de réaliser ce travail et pour tous leurs conseils pratiques.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance à M^me IRATNI G, pour avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes sincères remerciements à M^me SENOUSSI CH et M^me SI AHMED S pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Dédicaces

A mes très chers parents, à qui je dois ma réussite, tout mon respect et affection en témoignage de leurs soutiens.

A toute ma famille, tous mes amis et à tous ceux qui de loin ou de prés ont contribué à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION ……...01

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Généralités sur le lait ……03
I.1.1.Définition……...03
I.1.2. Composition du lait……...03
I.2. Le Camembert……..07
I.2.1. Définition……..07
I.2.2. Caractéristiques et valeur nutritionnelle…….07
I.2.3. Les étapes de la fabrication……...09
I .3. Caractéristiques et évolution de la phase d'affinage……..14
I .3.1. Les facteurs de variation de l'affinage ……....14
I.3.1.1. L'aération et la composition de l'atmosphère ……...14
I.3.1.2. L'activité de l'eau ……..15
I.3.1.3. La température ……...15
I.3.1.4. Le pH ……15
I .3.2. Les modifications biochimiques au cours de l'affinage ……..16
I.3.2.1. Fermentation du lactose ……..16
I.3.2.2. Hydrolyse de la matière grasse : Lipolyse……..16
I.3.2.3. La protéolyse ……17
I.3.2.4 . Le peptide bioactif…….....19
I .3.2.4.1. Les activités biologiques du peptide bioactif…….19
I.3.2.4.1.1. Activité anti-oxydante……...20

II. Partie expérimentale

II.1. Présentation de l'unité……..21
II.2. Matériel et méthodes……...22
II .2.1. Echantillonnage……....22
II .2.2. Processus de fabrication du fromage à pate molle type « camembert » au niveau de laiterie fromagerie STLD de TIZI OUZOU……..22
II.2.3. Analyses physico-chimiques……..24
II.2.3.1.Détermination du pH……..24
II.2.3.2.Détermination de l'acidité titrable……..24
II.2.3.3.Détermination de la densité……....25
II.2.3.4.Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode de GERBER …….....25
II.2.3.5.Détermination de l'extrait sec total et de l'extrait sec dégraissé …....25
II.2.3.6. Dosage des protéines par la méthode de Bradford …….....25
II .2.4. Détermination des paramètres technologiques…….....28
II.2.5. Suivi de l'affinage……..28
II.2.5.1. Suivi de la lipolyse……..28

II.2.5.2. Suivi de la protéolyse…….....29
II.2.5.3. Suivi de l'activité anti-oxydante…….....30
II.2.6. Analyse statistique des résultats…….....31
III. RESULTATS ET DISCUSSION……...…….33
III.1. Résultats des analyses physico-chimiques du lait…….33
III.2. Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum…….35
III.3.Résultats des analyses physico-chimiques du fromage……..36
III.4.Résultats des mesures des paramètres technologiques…….....38
III.5.Résultats du suivi de l'affinage des fromages……38
III.5.1. Suivi de la lipolyse……...39
III.5.2. Suivi de la protéolyse……..41
III.5.Résultats du suivi des activités biologiques…….....43
Conclusion……...46
Références bibliographiques…….....48
Annexes.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Composition moyenne du lait de vache…….....03

Tableau II : Variation de la composition du lait en fonction de l'espèce…….....04

Tableau III : Composition moyenne et distribution des protéines du lait…….05

Tableau IV : Composition moyenne comparée du lait et des fromages…….....08

Tableau V: Caractéristiques comparées entre le caillé lactique et présuré…….....12

Tableau VI : Valeurs moyennes des analyses physico-chimiques du lait…….....33

Tableau VII: Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum récupéré dans les 3 productions…….35

Tableau VIII : Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'affinage du camembert……...36

Tableau IX : Résultats des mesures du temps de prise et de coagulation du lait de vache au cours de la fabrication du camembert……...38

Tableau X : Evolution des moyennes des paramètres d'affinages…….39

Tableau XI : Les résultats du taux de maturation des fromages au cours de l'affinage……..42

Tableau XII : Résultats des activités anti-oxydantes et anti-radicalaires des différentes fractions des protéines des laits…….....43

LISTES DES FIGURES

Figure 01 : Schéma général de la fabrication du camembert industriel 10

Figure 02 : Lipolyse et β-oxydation des acides gras…… . 17

Figure 03: Diagramme de fabrication du camembert au niveau de la laiterie-fromagerie STLD de TIZI OUZOU…….... 23

Figure 04: Courbe étalon DO=*f* [BSA] pour le dosage des protéines 26

Figure 05: Schéma du protocole d'isolement des protéines sériques à partir du camembert…… .. 28

Figure 06: Courbe étalon V_{NaOH}= *f* [acide oléique] pour le dosage des acides gras libres…….. 30

Figure 07: Réaction se déroulant entre l'acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique et un acide aminé……..... 30

Figure 08 : Courbe étalon DO= *f* [glycine] pour le dosage des acides aminés..... 31

Figure 09 : Evolution du pH et de l'acidité des fromages au cours de différents stades d'affinage…… .. 38

Figure 10 : Evolution des taux d'acides gras libres au cours de l'affinage……..... 41

Figure 11 : Evolution du pouvoir chélateur dans les différentes fractions de protéines des fromages au cours de l'affinage……..... 45

Figure 12: Evolution de l'activité anti radicalaire dans les différentes fractions de protéines des fromages au cours de l'affinage…… .. 45

LISTE DES ABREVIATIONS

$[H_3O^+]$: concentration en ion hydronium

°D: degré Dornic

AAL : acide aminé libre

Acti R. caséines : activité anti-radicalaire des caséines.

Acti R.ANP : activité anti radicalaire de l'azote non protéique ;

Acti R.PS : activité anti-radicalaire des protéines seriques ;

Activité anti-rad : activité anti radicalaire

AFNOR : Association Française de Normalisation

AGL : acide gras libre

ANP: azote non protéique

Aw : activité de l'eau

BSA: sérum albumine bovine

DO: densité optique

DPPH: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène

ESD: extrait sec dégraissé

EST: extrait sec total

MAT : matière azote total

Met : méthionine

MG : matière grasse

MG: matière grasse

MGLA: matière grasse laitière anhydre

mM : milli mole

mM/l : milli mole/litre

MP: matière protéique

nm : nanomètre

NSLAB: bactérie lactique appartenant à la microflore secondaire

PCH. ANP : pouvoir chélateur de l'azote non protéique ;

PCH. Caséines : pouvoir chélateur des caséines.

PCH.PS : pouvoir chélateur des protéines sériques ;

Phe: phénylalanine

pH_i : pH isoélectrique

PS : protéines sériques

TB : taux butyreux

TCA : acide trichloracétique

TNBS : acide 2, 4, 6, trinitrobenzène sulfonique

β-Lg : β- lactoglobulines

Résumé

Cette étude a été menée dans le but de suivre l'évolution des réactions biochimiques au cours de l'affinage ainsi que la recherche de l'activité anti-oxydante des fromages fabriqués au niveau de la laiterie de STLD de Tizi-Ouzou.

A cet effet, des mesures des paramètres physico-chimiques ont été réalisées sur 3 lots de productions différentes du camembert au lait de vache, du lait jusqu'au produit fini.

La détermination des paramètres technologiques à savoir le temps de prise, le temps de coagulation a révélé que pour un temps de prise faible correspond un temps de coagulation faible. Les résultats physico-chimiques ont montré une augmentation (MG, EST, Protéines, etc) qui est due à la concentration de la matière sèche avec une désacidification de la pate au cours de l'affinage

Le suivi de la lipolyse par la détermination des taux d'acides gras libres a révélé des teneurs passant de 0,13 mM d'équivalent acide oléique /100g au 1er jour arrivant à 0,83 mM d'équivalent acide oléique/100g au 20eme jour.

Le suivi de la protéolyse par la détermination du taux d'acides aminés libre a révélé des taux qui évoluent durant l'affinage, elles passent de 0,52 m d'équivalent glycine/l au 1er jour jusqu'à 0,70 m mol d'équivalent glycine/l au 20eme jour, ce qui influe sur le taux de maturation, en effet on a observé une augmentation significative au cours des différents stades d'affinages.

L'activité anti-oxydante a été mise en évidence par l'utilisation de deux méthodes d'analyses : l'évaluation du pouvoir chélateur et anti-radicalaire, les résultats obtenus révèlent la présence de ces activités dans le lait et qui s'accentuent au cours de l'affinage. Ce qui démontre l'effet bénéfique de la consommation des fromages affiné contre le cancer colique.

Mots clés : lait/ lactosérum/ camembert/ affinage/ lipolyse/ protéolyse/ activité anti-oxydante.

Abstract

The aim of this research is to understand the evolution of the biochemical reactions during the ripening of the cheese produced by the MDPC of Tizi-Ouzou.

For this purpose, physicochemical measurements have been performed on three different lots of the brie production, cow's milk based only.

There is two very important factors that are inversely proportional: The time of the starter culture preparation and addition, the coagulation time. So, if the starter culture is low the coagulation time will be higher.

By monitoring the lipolysis, the results showed at the first day the oleic acid went from 0.13mM to 0.83mM at the 20^{th} day.

And by monitoring the proteolysis, the results showed that during the ripening, the ratio of the free amino acid went from 0.52mM at the first day to 0.70mM at the 20^{th} day, we did notice a significant increase during the different stages of the cheese ripening.

Two methods have been used to determine the anti-oxidant activity, the first one is by assessing chelator power and the anti-radical, the result we have gotten showed the presence of these actors in the milk and increases during the ripening. Therefore the studies showed and proved the important of consuming soft ripened cheeses that protect us against colon cancer.

Keywords: milk, lactosserum, brie, refining, lipolysis, proteolysis, anti-oxidant.

Introduction

Introduction

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb et le second pays au monde importateur de lait et de ses dérivés, avec une consommation annuelle de 100L de lait par habitant.

La filière laitière en Algérie est conditionnée par les importations du lait en poudre, car les besoins sont évalués à 3 milliards de litres/an, alors que la production nationale atteint 1,2 milliards de litres/an.

Ce chiffre explique, la stratégie mise en place pour le développement et l'encouragement de la production nationale en lait crû en améliorant le circuit de collecte du lait, par la disponibilité des moyens de réfrigération et de transport. Mais, les importations algériennes de lait ont connu, durant le premier semestre 2014 une importante hausse, la facture des importations de lait à atteint 1,13 milliards de dollars, contre 549,13 millions de dollars à la même période de 2013, enregistrant une hausse de 88,22%.

Selon les estimations de l'Office national interprofessionnel du lait (ONIL), l'Etat consacre annuellement plus de 46 milliards de dinars au soutien de la filière lait pour encourager la production et réduire la facture d'importation qui avait atteint l'année écoulée 1,13 milliard de dollars. Afin d'atteindre cet objectif, l'Etat a mis en place un dispositif de développement de la production laitière nationale qui prévoit, entre autres, une prime de 4 DA/litre pour l'intégration du lait crû dans le processus de transformation, alors que les laiteries qui utilisent totalement leurs capacités pour la production de lait en sachet à partir de lait crû ont une prime de 7 DA/litre.

Le lait est le premier aliment que nous consommons depuis notre naissance. Il joue un rôle essentiel dans notre régime alimentaire journalier puisqu'il est consommé en grande quantité sous forme de lait de consommation, de produits laitiers variés tel que le fromage.

Le fromage est l'un des plus anciens produits laitiers, il occupe une place importante dans la ration alimentaire, il est très apprécié par les consommateurs vu sa richesse en protéines animales, il permet de suppléer d'autres produits tels que la viande.

Il existe une multitude de fromage, parmi les plus grandes variétés on trouve le camembert. La qualité finale de ce produit est déterminée par la qualité de la matière première mise en œuvre ainsi que les conditions de fabrication. Le consommateur moderne cherche à lié le plaisir de la nourriture et la santé, car de nouvelles maladies sont à l'origine d'une mauvaise alimentation, le camembert s'avère être apprécier pour ses qualités organoleptiques en dépit de sa valeur biologique qui contribue à

diminuer le risque du cancer colique. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude dont l'objectif est de suivre l'évolution des paramètres physico-chimique et de contribuer à la mise en évidence de l'activité biologique des protéines au cours de l'affinage dans la protection contre les radicaux libres, par estimation du pouvoir antioxydant par l'utilisation de deux méthodes d'analyses: le pouvoir chélateur et réducteur dans ces derniers lors de l'affinage.

Synthèse bibliographique

I.1.Généralités sur le lait

I.1.1.Définition

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le Congrès International de la Répression des Fraudes en 1909, comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (LUQUET, 1990).

I.1.2. Composition du lait

Du point de vue physico-chimique, le lait peut être considéré comme une émulsion de matièregrasse dans une solution aqueuse contenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous (lactose, sels, vitamines, protéines et composés azotés solubles) et les autres sous la forme colloïdale (micelles de caséines, phosphate de Ca et Mg) (LUQUET, 1990).

Le Tableau suivantreprésente la composition moyenne du lait de vache.

Tableau I : Composition moyenne du lait de vache (ALAIS *et al*, 2008).

Constituants	**Composition (grammes par litres)**	**Etat physique des composants**
Eau	905	Eau libre (solvant) + eau liée
Glucides : Lactose	49	(3,7%) solution
Lipides Matière grasse proprement dite Lécithine (phospholipides) partie insaponifiable, stérols carotènes, tocophérols	35 34 0,5 0,5	 Emulsion des globules gras (3 à 5 microns de diamètre.)
Protides Caséines Protéines 'solubles' (globulines, albumines) Substances azotées non protéiques	34 27 5,5 1,5	Suspension micellaire de Phosphocaséinate de calcium solution (colloïdale) solution (vraie)
Sels : - l'acide citrique - l'acide phosphorique - l'acide chlorhydrique (HCl)	9 2 2,6 1,7	solution ou état colloïdal

Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	traces	
Extrait sec (total) Extrait sec non gras	127 92	

Il faut noter que ces composants du lait sont sujets à de multiples variations, qui tiennent à des facteurs intrinsèques (espèce, race, individu, état physiologique) et extrinsèques (mode d'alimentation, technique de trait, etc.) (COURTET LEYMARIOS, 2010).

La composition du lait diffère d'une espèce animale à une autre tel que l'illustre le tableau suivant :

Tableau II : Variation de la composition du lait en fonction de l'espèce (VIGNOLA, 2002).

Animaux	**Eau (%)**	**MG (%)**	**Protéines (%)**	**Glucides (%)**	**Minéraux (%)**
Vache	87,5	3,7	3,2	4,6	0,8
Chèvre	87,0	3,8	2,9	4,4	0, 9
Brebis	81,5	7,4	5,3	4,8	1,0
Chamelle	87,6	5,4	3,0	3,3	0,7
Jument	88,9	1,9	2,5	6,2	0,5

I.1.2.1.Les protéines du lait

Les protéines du lait représentent 95% des matières azotées totales. Les 5% restants représentent les composés azote nonprotéiquedu lait (VIGNOLA, 2002). L'urée en est le constituant principal, représente environ la moitié de l'ANP. Parmi les autres constituants figurent les acides aminés libres, la créatine, acide urique, créatinine et ammoniaque (COLIN, 1990).

Les protéines sont constituées soit d'acides aminés seulement (α–lactoglobulines, ß-lactalbumine), soit d'acides aminés et d'acide phosphorique (caséines α et ß) avec parfois encore une partie glucidique (caséine k) (COURTET LEYMARIOS, 2010). Une vingtaine d'acides aminés interviennent dans la composition de ces protéines, leur séquence conférant à chaque protéine des propriétés propres. C'est sur la base de la précipitation à pH 4,6 (à 20°C) ou sous l'action de la présure qu'on sépare deux constituants : La ou plutôt les caséines (α, β, γ et κ) et les protéines solubles ou protéines du lactosérum (GUILLOU *et al*, 1986) (voir tableauIII).

Les protéines du lait forment un ensemble assez complexe constitué de :

•80% de caséines,

•20% de protéines solubles: β-lactoglobulines, α-lactalbumines, sérum albumines, immunoglobulines, etc. (ECK *et al*, 2006).

TableauIII : Composition moyenne et distribution des protéines du lait (FAO, 1998).

	Moyennesabsolues g/l	**Moyennes relatives %**
Matières azotées totales	34	100
Protéines	32	94
Protéines non solubles ou caséine entière	26	82
Protéines solubles	6	18
α -lactalbumine	2,7	45
β-lactoglobulines	1,5	25
Sérum-albumine	0,3	5
Globulines immunes	0,7	12
Protéoses peptones	0,8	13
Substances azotées non protéiques	2	6

I.1.2.1.a. Caséines

Les caséines sont des polypeptides phosphorés associés à des constituants minéraux, en particulier le calcium, mais aussi le phosphore, le magnésium et le citrate, de manière à former des micelles de phosphocaséinate de calcium. En présence de calcium, elles forment des unités qui agrègent plusieurs milliers de molécules, constituant les micelles de caséines dispersés dans la phase hydrique du lait (diamètre variant de 100 à 250 µm)(VIGNOLA, 2002). Cette configuration spatiale permet aux enzymes hydrolytiques (carboxypeptidases) une digestion plus aisée (CAYOT *et al*, 1998).

I.1.2.1.b. Protéines solubles ou protéines du lactosérum

Les protéines seriques ou protéines du lactosérum sont nettement moins abondantes que les caséinesce qui est représenté dans le tableau III,elles ne représentent que 15 à 22% des protéines du lait de vache, environ 17% de ses matièresazotées totales. Elles floculent difficilement en présence de présure. Par contre à l'exception des protéoses-peptones, elles sont dénaturées par la chaleur et sont entraînées lors de la coagulation de la caséine sous l'action de la présure (MATHIEU, 1998).

Son constituant essentiel (50-55%) est la ß-lactoglobulines bovine, totalement absente dans le lait humain. La deuxième protéine soluble (20-25%) du lait bovin est par ordre d'importance l'α-lactalbumine. Elle est présente dans le lait de tous les mammifères qui sécrètent du lactose puisque cette protéine est partie intégrante de l'enzyme de synthèse du lactose (ECK, 1990).

Parmi les protéines solubles restantes certaines, comme la sérum-albumine, ont une faible valeur nutritionnelle. La lactoferrine bovine est porteuse de fer, sous la forme d'ions ferriques (Fe^{+3}) ce qui lui confère une stabilité en présence d'ion ferriques (VIGNOLA,2002). Les protéines du lactosérum ont une valeur nutritive majeure en nutrition humaine, car elles sont riches en acides aminés essentiels (COURTET LEYMARIOS, 2010).

1.1.2.2. Matière grasse

La matière grasse ou taux butyreux représente 25 à 45 g/litre (LUQUET, 1985). Elle est constituée par 98,5% de glycérides (esters d'acide gras et de glycérol), 1% de phospholipides et 0,5% de substances liposolubles cholestérol, hydrocarbures et vitamines A, D, E, et K (GOURSAUD, 1985).

La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé (BOUTONNIER, 2008).

Cet état globulaire est fragile ; toute altération de la membrane par voie chimique, physique ou microbienne conduit à la déstabilisation de l'émulsion. Cette évolution peut être accidentelle, elle se traduit alors le plus souvent par une séparation de la phase grasse sous forme d'huile ou d'agrégats et/ou par l'apparition de flaveurs indésirables (rancidité-oxydation) ; lorsqu'elle est dirigée, elle permet la concentration de la phase grasse sous forme de beurre après barattage, ou sous forme d'huile de beurre et de matière grasse laitière anhydride après chauffage et centrifugation (MADJI, 2009).

I.1.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait

1.1.3.1.Densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (VIERLING, 2008).

1.1.3.2. 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 (CIPCLAIT,2011).

On exprime couramment l'acidité d'un lait en degrés Dornic ; ce dernier étant le nombre du dixième de millilitre de soude utilisée pour titrer 10 millilitres de lait en présence de phénolphtaléine.

Deux laits peuvent avoir le même pH et des acidités titrable différentes et inversement. C'est à dire qu'il n'y a pas de relation d'équivalence réelle entre le pH et l'acidité de titration (DIENG, 2001).

1.1.3.3. pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraicheur 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 entraine une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH, car:

pH= log 1/ [H_3O^+]

A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait (CIPC LAIT, 2011).

Un lait mammiteux, contenant des composés à caractéristiques basiques, aura un pH > 7 et le colostrum un pH voisin de 6 (LUQUET, 1985).

I.2.Le camembert

I.2.1.Définition

Selon VEISSEYRE (1975), le Camembert est défini comme étant un fromage à pâte molle, à caillé non divisé en forme de cylindre plat. Il a un diamètre de 10 à 11 cm et une épaisseur de 3 cm. Il renferme au moins 40g de matière grasse pour 100g de camembert,après une dessiccation complète, le poids total de la matière sèche ne doit pas être inferieurà110 g.

Le Camembert est un fromage originaire de Normandie (France),à pâte molle à croute moisie, obtenu par action de la présure, un affinage après fermentation lactique mais dont la pate n'est ni cuite ni pressé, l'égouttage est lent et réalisé par un simple découpage et éventuellement un brassage (GUIRAUD, 2003). Il est obtenu par coagulation mixte à égouttage spontané (MIETTON, 1990).

I.2.2.Caractéristiques et valeurs nutritionnels

Les fromages sont des formes de conservation et de report ancestral de la matière utile du lait (protéines, matières grasses ainsi qu'une partie du calcium et phosphore), dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (JEANTET *et al*, 2007).

Selon son mode d'élaboration, le Camembert renferme 30 à 50 % de matière azotée / matière sèche. Il s'inscrit ainsi parmi les meilleures sources alimentaires de protéines ayant une digestibilité élevée (MIETTON, 1995).De plus, la haute valeur biologique de ces protéines lui est conférée tant par leur composition équilibrée en acides aminés, que par leur propriété de former une pate fromagère très appréciée par les consommateurs dans de nombreuses régions du monde.L'onctuosité des fromages due essentiellement à la composition chimique du coagulum (ECK, 1975). Concernant le lactose, il faut noter que les fromages affinés sont pratiquement dépourvus de glucides car la faible quantité de lactose, restant dans le caillé après égouttage, est transformée en acide lactique au cours de l'affinage.

Pour les autres nutriments, le Camembertconstitue un apport important en calcium.(200 à 700 mg/ 100g), en phosphore, en sodium et en vitamines (notamment du

groupe B) (ECK, 1990).Le tableau suivant, donne une composition comparative du lait et du fromage.

Tableau IV : Composition moyenne comparée du lait et des fromages (ALAIS et LINDEN, 1993).

Constituants	**Lait**	**Fromage**
Eau	Environ 87%	Eliminée en partie par la fabrication. Teneur en eau varie de :35 % (pâte cuite dure),50 % (pâte molle),80 % (Fromage frais)
GLUCIDES	- Lactose 5% Les ferments lactiques transforment le lactose en acide lactique, ce sucre peut être également transformé en alcool	- Pratiquement éliminé avec l'eau par lafabrication.
LIPIDES	- Environ 4 % * Sous forme de globules gras très petit en émulsion dans le liquide ; Ce sont en majeure partie des triacylglycérols (beaucoup d'oléine) avec un peu de lécithines.	- Se retrouvent dans la majorité des fromages sauf dans les fromages « maigres » ; 23 % fromages à pâte molle ;30 % fromages à pâte dure.
PROTEINES	- Environ 3,5 %.Les plus importantes en quantités sont les caséines : 3 %, Les protéines du sérum sont aussi d'un apport non négligeable.	- La caséine coagulant avec la présure, est l'élément essentiel de touts les fromages (même maigre) : • 18 % fromages à pâte molle, • 19 % fromages blancs au lait écrémé, • 24 % fromages à pâte ferme.
MINERAUX	- Très intéressante valeur minérale car très riche en calcium et en phosphore. Le calcium étant plus abondant que le phosphore, le rapport Ca / p= 1,39 donc le lait est recalcifiant. Contient aussi potassium et chlorure de sodium : - Pas de fer.	- Grande richesse en calcium et en phosphore, surtout dans les fromages àpâte ferme rapport Ca / p= 1,26 enmoyenne, donc c'estun aliment recalcifiant; - Plus au moins riches en chlorures desodium selon leur fabrication (adjonction de sel, pâte lavée à l'eau salée, etc.).
	- B1 en petite quantité - B2 assez importante.	- Les fromages fermentés à pâte molle,notamment les

VITAMINES	- C en quantité variable dans le lait frais, mais pratiquement détruite au contact de l'air durant les manipulations et le transport et par la pasteurisation et l'ébullition. - A en quantité importante dans la MG, donc absente dans les laits écrémés. - D en quantité variable selon la saison.	fromages bleus, sont debonnes sources de vitamines B, du faitdes synthèses réalisées par lesmoisissures. - Se retrouve dans le fromage selon lateneur en MG.

I.2.3. Les étapes de fabrication du camembert

La production du fromage comprend une multitude d'étapes comme la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage. Ces étapes visent à organiser la microstructure du caillé et ainsi obtenir la fermeté, la consistance et l'élasticité désirée au produit (LESSARD, 2014) (figure 01).

I .2.3.1. La nature de la matière première

La fabrication du fromage à pate molle type Camembert exige l'emploi d'un lait de haute qualité bactériologique et physico-chimique.Ainsi, dans les pays à grandes traditions fromagères tel que la France, ce fromage est élaboré, soit directement à partir du lait crû, soit à partir du lait pasteurisé. Dans les pays où la production en lait cru est déficitaire (cas de l'Algérie où cet apport ne couvre que 40% des besoins), il est fait appel au lait recombiné, constitué de produits d'importation (poudre de lait et matière grasse laitière anhydre : MGLA) auxquels sont additionnés des volumes appropriés d'eau de reconstitution (BACHTARZI, 2012). L'aptitude à la transformation du lait en fromage (fromageabilite) est dépendante d'un certain nombre de paramètres dont :

- sa composition chimique (notamment sa richesse en caséines) ;
- sa charge microbienne et la nature de sa microflore ;
- son aptitude au développement des bactéries lactiques ;
- enfin, son comportement vis à vis de l'enzyme coagulante à savoir la présure (REMEUF *et al*, 1991).

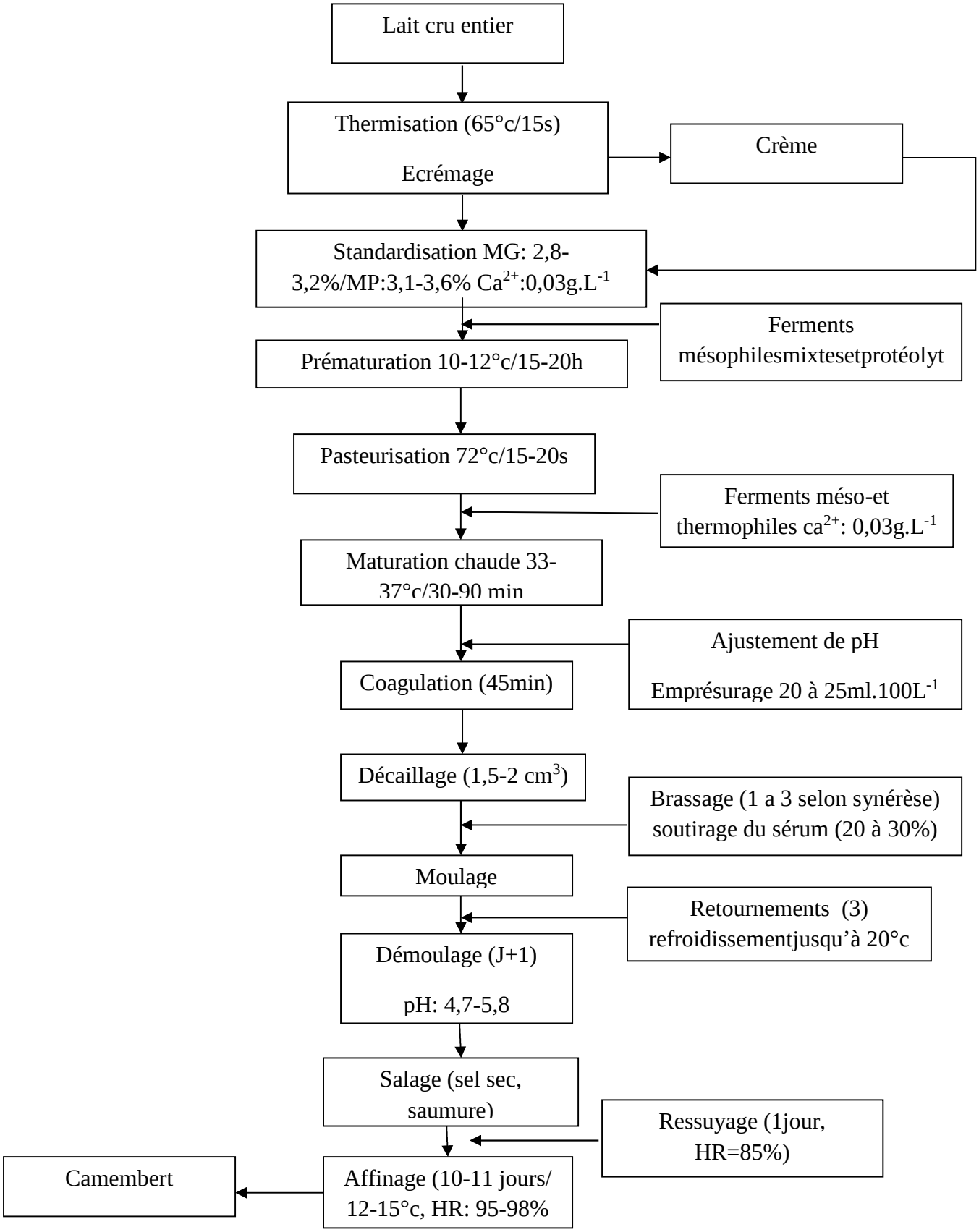

Figure 1 : Schéma général de la fabrication du camembert industriel (JEANTET *et al*, 2008).

I.2.3.2. Traitements préliminaires du lait

I.2.3.2.1.Standardisation et homogénéisation

L'écrémeuse-standardisatrice permet d'harmoniser la composition des laits provenant de différentes exploitations, en particulier pour faire correspondre le taux de matière grasse à celui exigé par la législation dans les laits de consommation et les produits laitiers (VIGNOLA, 2002).

Après standardisation il ya lieu d'homogénéiser tout le liquide, afin de stabiliser l'émulsion de matière grasse. L'homogénéisation est une action mécanique réalisée à une température supérieure à 60°C dans un homogénéisateur. Elle a pour but de stabiliser l'émulsion de la matière grasse du lait par la réduction du diamètre des globules gras à environ 1 micron et ce grâce à une pression exercée sur le lait de 100 à 200 bars (BOURDIER et LUQUET, 1991).

I.2.3.2.2. Traitements thermiques

Les laits mis en œuvre dans l'industrie fromagère peuvent être crûs ou subisà des traitements thermiques préalables dont l'importance se manifeste dans leurs assainissements ainsi que dans leurs stabilisations (LESSARD, 2014). Selon la température atteinte et la durée du chauffage, le traitement thermique utilisé influe, d'une part, sur la concentration de la flore microbienne initiale et d'autre part, sur la composition physico-chimique du lait. Les modifications qui en découlent engendrent dans la plupart des cas un changement des caractéristiques du lait et conditionnent pour une grande part la qualité du produit fini en particulier sa valeur nutritive (ECK, 1990).

La thermisation (traitement qui a lieu à 64°C pendant 15 à 20 secondes) est surtout utilisée pour détruire les bactéries psychrotrophes, qui se développent dans un lait ayant subi, soit une réfrigération à la ferme, soit un stockage réfrigéré au niveau de la fromagerie. Ces bactéries produisent des lipases et des protéases exo-cellulaires résistantes à la pasteurisation (72-74°C, 15-20 secondes). Ces enzymes peuvent être responsables de goûts désagréables (malté, amer, rance), et des pertes de rendements fromagers (LENOIR *et al*, 1983).

I.2.3.3. La phase d'ensemencement et de maturation

C'est l'étape d'introduction de la flore lactique sélectionnée qui va participer, d'une part à la coagulation du lait (en provoquant l'acidification) et d'autre part à l'affinage du fromage (rôle dans l'activité protéolytique).

Un temps de maturation suffisant est laissé dans le but de permettre la multiplication et le développement des souches de bactéries lactiques inoculées (BERTRAND, 1988).

La maturation du lait a deux objectifs :

-rétablir les équilibres physico-chimiques du lait donnant une meilleure aptitude à la coagulation ;

- permettre le développement d'une flore dominante de bactéries lactiques au détriment des germes nuisibles qui ont échappé à la pasteurisation. Les caractéristiques du caillé sont représentées dans le tableau suivant.

Tableau V: Caractéristiques comparées entre le caillé lactique et présuré (ECK *et al*, 2006).

	CAILLE LACTIQUE	**CAILLE PRESURE**
Obtention	Action des bactéries lactiques	Action de la présure (mélange de chymosine et de pepsine)
Mécanismes	L'apport d'une quantité croissante d'acide lactique déstabilise progressivement les micelles de caséines, les H^+ neutralisant les charges négatives présentes en périphérie des micelles. Les micelles déstabilisées vont s'unir pour former un gel, réseau protéique qui piège la matière grasse et la phase aqueuse.	L'action de la présure se décompose en 2 phases : - phase primaire enzymatique où la présure lyse spécifiquement la caséine κ et lui fait perdre ses propriétés stabilisantes ; - phase secondaire où les micelles déstabilisées s'agrègent grâce à des liaisons minérales essentiellement calciques pour former un gel homogène.
Facteurs de coagulation	• Lait riche en protéines coagulables •Acidification lente et progressive	• Lait riche en caséines et en calcium dissous • Température et pH au moment de l'emprésurage (température et pH optimaux de la présure voisins de 40°C et pH 5)
Structure physique	Faible cohésion entre les micelles et les submicelles.	Micelles soudées entre elles par des liaisons calciques.
Propriétés du caillé	Déminéralisé car l'acidification induit la solubilisation des sels minéraux dans le sérum ; Fragile et friable	Minéralisé Déformable et élastique
Egouttage	•Le sérum s'écoule spontanément entre les micelles • Egouttage spontané, lent et limité • Niveau d'égouttage faible	•A cause de la cohésion entre les micelles le sérum ne peut s'écouler qu'en périphérie. • Egouttage mécanique rapide et poussé • Niveau d'égouttage fort
Conséquences en fromagerie	Fromage humide de petit format ; Extrait Sec 10-35% pH caillé ≤ 4,6 ; Conservation courte (Quelques semaines si affinage)	Fromage sec de gros format Extrait Sec 50-60% pH caillé ≥ 5,2 Conservation longue

I.2.3.4. 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 (MATHIEU, 1998).

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).

- La coagulation acide : La diminution concomitante du pH a pour effet de régresser l'ionisation des fonctions acides des caséines, induisant le déplacement progressif du calcium et du phosphore inorganique de la micelle vers la phase aqueuse. A pH 6,5-5,2 il ya solubilisation du phosphate de calcium et à pH 5,2-4,6 le complexe se dissocie, ce qui induit la désorganisation des micelles et une réorganisation des sous unités micellaires. Ces dernières, vont se lier entre-elles et former un gel cassant, très friable et peu élastique (MIETTON, 1995).
- La coagulation enzymatique : elle est due à l'action de la présure. 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 (ECK, 1990).

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 floculer pour former un gel ferme, compact et ayant une bonne cohésion (VEISSEYRE, 1975).

I.2.3.5. L'égouttage

C'est l'étape qui permet la séparation du lactosérum du caillé. Son but est non seulement de régler la teneur en eau du caillé mais aussi la minéralisation de ce dernier et son délactosage. Selon BERTRAND (1988), il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires :

- expulsion du sérum par le coagulum qui se contracte et se concentre (synérèse);
- séparation du sérum et du caillé par action physique.

I.2.3.6.Le salage

Le salage s'effectue soit on saupoudrant la surface des fromages par du sel, ou on immergeant les fromages dans une saumure. La saumure comprend 19-21 % de NaCl, d'environ 0,2% de $CaCl_2$, et a un pH proche de celui du fromage au démoulage et à une température entre 10-14 °C. En plus de ses rôles sensoriels et nutritionnels, le sel a des fonctions technologiques importantes pour la production des fromages (JEANTET *et al*, 2008).

Pendant le salage en saumure, le fromage perd de l'humidité et gagne du sel, c'est ce phénomène qui permet d'atteindre un équilibre osmotique entre le caillé et la saumure. Il se crée donc un gradient décroissant de sel vers le centre du fromage, et un gradient croissant d'eau. L'immersion en saumure saturée permet la formation d'une croûte plus sèche à la

surface des fromages, ce qui conserve leur forme et limite leur prise en sel. Une perte de calcium peut aussi s'observer, mais l'ajout de $CaCl_2$ à la saumure permet de prévenir ce phénomène (LESSARD, 2014).

Le sel ajouter au fromage permet de rehausser la saveur finale mais il fait plus :

- il complète l'égouttage sous l'effet de la pression osmotique ;
- il arrête l'acidification du caillé et prévient une déminéralisation excessive de la pate ;
- il contrôle le développement des bactéries nuisibles ou pathogènes et sélectionne le développement des micro-organismes utiles à l'affinage (ALAIS et LINDEN, 1993 ; VIGNOLA, 2002).

I.2.3.7. L'affinage

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique où sous l'action d'enzymes, pour la plupart élaborées par la flore microbienne présente, les constituants du caillé sont dégradés. La pâte est ainsi modifiée dans son aspect, sa texture et sa consistance, ce qui lui permet de passer sous la forme d'un produit élaboré dénommé fromage.

Selon MIETTON (1995), L'affinage est en fait la résultante de trois principales actions biochimiques qui se déroulent simultanément à savoir :

- la dégradation des protéines ;
- l'hydrolyse de la matière grasse ;
- la fermentation du lactose.

I .3. Caractéristiques et évolution de la phase d'affinage

L'affinage correspond à diverses transformations biochimiques (protéolyse, lipolyse, glycolyse…) qui résultent de l'activité des enzymes natives du lait ou de celles qui sont issues de micro-organismes rajoutés à ce dernier en vu de sa transformation en fromage (bactéries lactiques et moisissures).

Ce sont ces modifications souhaitées qui sont responsables de la maturation du coagulum et de l'obtention d'un produit dérivé ayant des caractéristiques organoleptiques recherchées (UPADHYAY*et al*, 2004).

I .3.1. Les facteurs de variation de l'affinage

L'affinage des fromages est en 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 : la température, l'humidité, l'indice de disponibilité de l'eau, le pH et la composition de l'atmosphère (LAMONTAGNE *et al*, 2002).

I.3.1.1. L'aération et la composition de l'atmosphère

La composition de l'atmosphère peut intervenir dans le processus d'affinage. Les besoins en oxygène des microorganismes sont variables. Certains microorganismes

comme les bactéries propioniques, sont anaérobies stricts et se développentà l'intérieur du caillé. D'autres sont micro-aérophiles, comme les lactobacilles, et se cultivent mieux dans un environnement à teneur limitée en oxygène. D'autres, enfin, sont strictement aérobies, comme les levures et les moisissures, et ne peuvent se développer qu'en surfacedes fromages.Les fromages affinés sous l'action de ces derniers sont, selon CHOISY et *al* (1984), de petit format.

La teneur de l'air en oxygène devient donc importante pour les fromages dont l'affinage se fait principalement en surface (VIGNOLA *et al*, 2002).

I.3.1.2. L'activité de l'eau et l'humidité

La teneur en humidité d'un fromage influence la vitesse de l'affinage. Ainsi, les pates molles sont le siège d'une fermentation et d'une transformation plus rapides que les pates fermes. D'ailleurs, la teneur en eau est l'un des deux paramètres qui ont une incidence directe sur l'indice de disponibilité de l'eau A_w dans un fromage. Cet indice, pour un aliment donné, se définit comme le rapport entre la pression de vapeur d'eau et celle de l'eau pure à la mêmetempérature. Il indique, d'une certaine manière, l'eau disponible dans un fromage pour les diverses réactions nécessitant une phase aqueuse (LAMONTAGNE *et al*, 2002). L'activité de l'eau est un facteur important dans le développement microbien (COGAN, 2011).

La teneur en sel a un effet direct sur la disponibilité de l'eau, plus la teneur en sel est élevée plus cet indice est faible, et exerce une action sélective et inhibitrice sur la microflore, voire sur les activités enzymatiques ; il constitue par le fait même un moyen de contrôler l'affinage (ECK *et al*, 2006).

I.3.1.3. La température

La température est l'un des facteurs importants àcontrôler lors de l'affinage puisque, pour un fromage donné, l'activité microbienne et enzymatique varie selon la température. En général, on maintient volontairement les températures d'affinage au dessous des conditions optimales pour ralentir la croissance de la microflore, donc pour mieux la contrôler et donner le temps aux enzymes de jouer leur rôle. A noter qu'à basse température, les protéases et surtout les lipases conservent une activité relativement importante. En règle générale, on affine à plus basse température les fromages les plus humides, le fait d'augmenter ou de réduire la température d'affinage permet de ralentir ou d'accélérer la vitesse d'affinage (LAMONTAGNE *et al*, 2002).

I.3.1.4. Le pH

Le pH influence le développement microbiens et l'activité enzymatique. Parmi les microorganismes, seules les bactéries lactiques, les levures et les moisissures peuvent se développerà des pH inferieurs à 5. L'activité des enzymes est aussi très sensible aux variations de pH. L'activité de la plupart des protéases microbiennes est maximale entre le pH

5 et 5,7, tandis que celles des lipases se situe dans la zone de 7,5 et 9. A un pH inferieur à 4,5, l'activité de nombreuses enzymes est fortement réduite (GOBBETTI *et al*, 1999).

En généraleà la fin de l'égouttage, le pH est inferieur à 5,5 et le lactose résiduel est transformé en acide lactique. Cette fermentation freine l'action des enzymes et réduit le développement d'une flore bactérienne nuisible comme les coliformes. Cependant, uneacidification trop accentuée peut réduireconsidérablement l'affinage.

Dans le cas des fromages à pates molle où le pH atteint environ 4,3 au début, ce niveau d'acidité ne permet pas de protéolyse. Ce n'est qu'après neutralisation par l'action des levures et des moisissures de surface qui utilise l'acide lactique que les protéases agissent (LAMONTAGNE *et al*, 2002).

I .3.2. Les modifications biochimiques au cours de l'affinage

I.3.2.1 .La fermentation du lactose

Le lactose peut être métabolisé par de nombreux micro-organismes présents dans le lait et les pates fromagères. 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-Meyerhof) et secondairement selon la voie des pentoses phosphates (MARILLEYet CASEY,2004).

I.3.2.2. L'hydrolyse de la matière grasse : Lipolyse

La lipolyse est définie comme étant l'hydrolyse des lipides en acides gras libres (DEETH, 2011). Elle contribue à trois caractéristiques organoleptiques majeures soit la texture, la solubilité de certains composés aromatiques et la production de précurseurs de flaveurs (LECLERCQ *et al*, 2007). La voie de la lipolyse a été caractérisée comme étant la voie majeure du développement de flaveurs, par exemple dans les fromages bleus (FLICEK *et al*, 2009 ; COLLINS *et al*, 2003). La lipolyse observée dans le Camembert est causée par les estérases des bactéries lactiques des ferments, les lipases résiduelles du lait et les lipases de la microflore fongique. Malgré que ce soit surtout les moisissures qui sont connus comme étant lipolytiques, les levures d'intérêt fromager possèdent des gènes codant pour des lipases.

Geotricum candidum (G. candidum) modifie les profils d'acides gras dans le camembert grâce à ses lipases (ST-GELAIS et TIRARD-COLLET, 2002). L'activité lipolytique de *G. candidum* se mesure par la grande quantité d'acide oléique et d'autres acides gras insaturés à longue chaîne dans les fromages.Les acides gras à longue chaîne (> 12 carbones) produits lors de la lipolyse ont peu d'impact sur la flaveur des fromages étant donné leur très haut seuil de détection (MOLIMARD *et al*, 1996). Ce sont surtout les acides gras libres à courte chaîne (entre 4 et 12 carbones) qui contribuent directement à l'arôme de fromages âgés (COLLIN *et al*, 2003). Les acides gras libérés par lipolyse sont principalement les précurseurs de molécules d'arôme lors de cycles successifs de β-oxydation, une voie métabolique ayant comme objectif premier de réduire la toxicité des 20 acides gras pour les mycètes (SPINNLER *et al*, 2004).Dans ce cycle, les acides gras sont sujets à 5 réactions enzymatiques (Figure 02). Un seul cycle mène à la production d'une molécule d'acétyle-coA redirigée dans le cycle de Krebs afin de générer de l'énergie, et un acyl-coA qui peut subir

d'autres cycles de β-oxydation, jusqu'à épuisement de la chaîne de carbone (TROTTER, 2001 ; MAGGIO-HALL *et al*, 2004).Lorsqu'ils sont en faible concentration, les acides gras sont complètement oxydés en eau (H_2O) et en CO_2. Dans le cas contraire, par exemple dans une matrice fromagère, une β-oxydation partielle est observée.

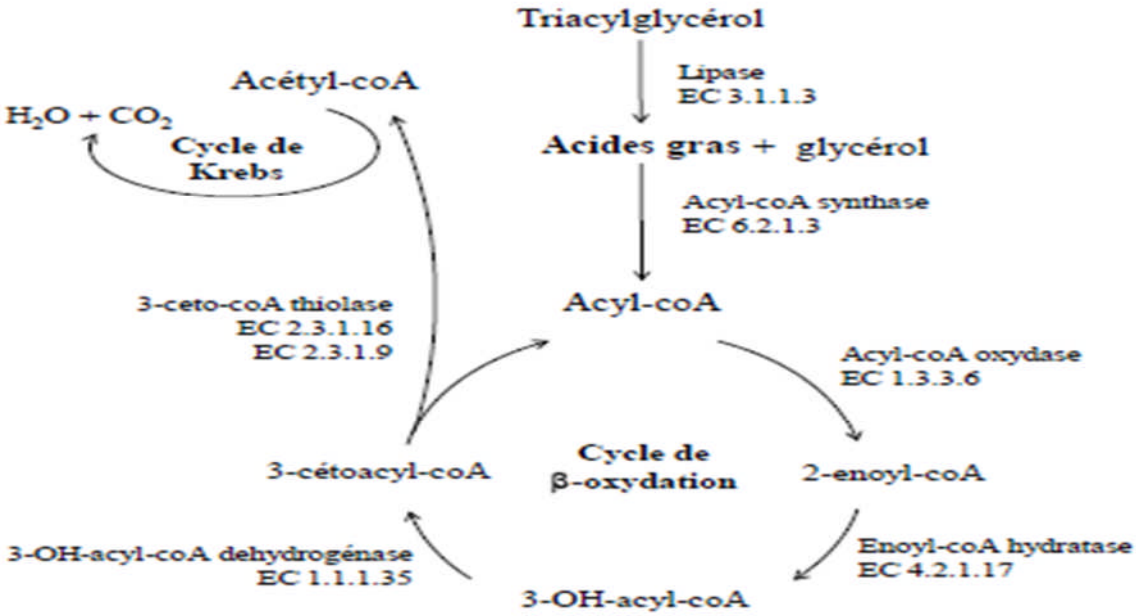

Figure 2 : Lipolyse et β-oxydation des acides gras (KINSELLA *et al*, 1976).

I.3.2.3. La protéolyse

La protéolyse se définit comme étant l'hydrolyse des protéines et des peptides en acides aminés (UPADHYAY *et al***,** 2004). Elle est le processus biologique le plus complexe et le plus important qui a lieu pendant l'affinage des fromages. Elle participe au développement de la texture étant donné l'hydrolyse de la matrice fromagère, l'abaissement de l'A_w par la libération de molécules d'eau engendrée par cette hydrolyse permet indirectement l'augmentation du pH (LECLERQ *et al*, 2004) par la libération d'ammoniac lors de la désamination des acides aminés (MC SWEENEY *et al*, 2000).

En plus, la protéolyse joue un rôle majeur dans le développement des flaveurs du fromage en générant de courts peptides ainsi que des acides aminés libres qui seront éventuellement transformés en composés d'arômes (YVON *et al*, 2001).

La protéolyse dépend des protéinases et des peptidases qui proviennent principalement du coagulum, du lait, des ferments lactiques et de la microflore secondaire lactique (NSLAB) et non lactique qui comprend entres autres les mycètes d'affinage (LESSARD, 2014).

I .3.2.3.1. Les enzymes protéolytiques et leurs actions :

Les enzymes protéolytiques intervenants en cours de maturation et d'affinage desfromages ont des origines diverses :

- les protéases indigènes ou natives du lait telles la protéase alcaline, la protéase acide, etc. ;

- les protéases exogènes rajoutées au lait dans le but de le coaguler telle la présure oules substituts de l'enzyme coagulante (ECK, 1990).

I.32.3.1.1. La protéase alcaline (plasmine)

Cette protéase native du lait présente de fortes analogies avec la plasmine sanguine.Elle appartient au groupe des sérine-protéases et présente une activité de type trypsique. Elle montre une activité maximale à 37°C et à pH 7,4 - 8,0 (HUMBERT et ALAIS, 1979). Cette enzyme présente une thermorésistance relativement élevée. En effet, selon SNOEREN *et al* (1979), 20% de l'activité protéolytique sont conservés à pH 7 après chauffage du lait à 70°C/ 10 min. La protéase alcaline dégrade préférentiellement la caséine β en caséines γ 1, γ 2, γ3 et protéoses-peptones ainsi que la caséine à α s2. La caséine k est la plus résistante à la protéolyse. Cette enzyme est sans effet sur les protéines du lactosérum (ANDREWS, 1979).

I.3.2.3.1.2. La présure

La présure (ou son composant majoritaire la chymosine), qui est une endopeptidase appartenant au groupe des carboxyles-protéases, est le premier agent à intervenir dans les mécanismes d'hydrolyse de la caséine. En effet, elle est rajoutée au lait pour qu'elle intervienne dans la phase de coagulation en clivant spécifiquement la caséine κ au niveau de la liaison Phe105-Met106.

Cette enzyme exerce au cours de l'affinage, une action de protéolyse générale sur les caséines αS1 et β. Deux liaisons sont particulièrement sensibles sur la caséine αS1. Il s'agit de: Phe23 - Phe24 et Phe24 - Val25 dont la rupture produit les peptides 24 – 199 et 25 – 199 qui sont moins hydrophobes que la caséine αS1 (VISSER et DE GROOT–MOSTERT, 1977).

I.3.2.3.1.3.Les protéases d'origine microbienne

Les enzymes coagulantes d'origine microbienne se révèlent plus protéolytiques que la présure de veau (VISSER et DE GROOT-MOSTERT, 1977). En effet, elles dégradent plutôt et plus rapidement la caséine β, alors que la présure de veau ne la dégrade que très faiblement (DESNOUVEAUX *et al*, 1986).

I.3.2.3.1.4. La protéase acide

Cette protéase présente une activité maximale à pH 3,5 – 4,0 et à 50°C. Elle agit préférentiellement sur la caséine αS1 (NOOMEN, 1978), sa spécificité sur la caséine κ est comparable à celle de la chymosine (KAMINOGAWA *et al*, 1972). Sa stabilité thermique est assez élevée car un chauffage à 70 °C pendant 10 minutes est nécessaire pour l'inactiver (CHOISY*et al*, 1984).

I.3.2.4 .Les peptides bioactifs

L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait peut libérer des fragments capable d'exercer des activités biologiques spécifiques, telle que l'anti hypertension, anti microbien, opioïde, antioxydant, immunomodulant. De telsfragments de protéines, connus sous le nom de peptides bioactifs, sont formés d'une protéineprécurseur inactive pendant la digestion gastro-intestinale et/ou pendant la transformation des produits alimentaires (KUNENE *et al*, 2000). En raison de leur polyvalence physiologique et physico chimique, les peptides du lait sont considérés comme composant fortement proéminent pour la santé favorisant des applications pharmaceutiques et alimentaires (MAHI, 2010). Il est aujourd'hui incontesté qu'en plus d'une valeur nutritive, les protéines ont des propriétés fonctionnelles et biologiques, et que ces dernières peuvent être influencées par des procédés technologiques.

Diverses protéines alimentaires peuvent être utilisées comme sources de peptides bioactifs (LEONIL *et al*, 2002). Etant inactifs à l'intérieur de la chaîne d'acides aminés, ces peptides doivent auparavant en être extraits pour pouvoir développer leur action physiologique. Au cours de la fermentation, les protéines sont dégradées par les protéases et la présure naturellement présentes dans le lait ainsi que par les protéinases et les peptidases de microorganismes protéolytiques. Au cours de ce processus, il y a formation de peptides bioactifs. Les produits laitiers sont actuellement considérés comme nos principaux fournisseurs de peptides bioactifs, même si d'autres protéines de provenance animale, et même des protéines végétales, contiennent également des séquences potentiellement bioactives (WALTHER, 2006).

I .3.2.4.1. Les activités biologiques du peptide bioactif

Divers peptides bioactifs ont été trouvés dans le lait et les produits laitiers, la première fois en 1979, à l'exemple des casomorphines, séquences extraites des caséines. Ces peptides déploient des activités opiacées et ont ceci de particulier qu'ils sont capables de se lier à des récepteurs spéciaux situés à la surface des cellules cérébrales et nerveuses (récepteurs à opioïdes) (LEONIL, 2013).

Les antioxydants préventifsont une action stabilisatrice en décomposant par exemple les peroxydesen des produits stables de terminaison ce qui empêche directement la formation des radicaux libres. Ils peuvent aussi chélater les catalyseurs des réactions d'oxydation tels que les ions métalliques ou bien réagiravec l'oxygène. Par ailleurs, de nombreuses études ont déjà décrit l'activité anti-oxydante d'hydrolysats de protéinestels que la caséine du lait (SUETSUNA *et al*, 2000).

I.3.2.4.1.1.Activité anti-oxydante

Les protéines du lait sont des précurseurs de peptides à activité anti-oxydante grâce à leur richesse en certains acides aminés comme l'histidine ou en acides aminés hydrophobes. Les peptides dérivés de ces protéines sont capables d'inhiber la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux libres. Quelques rares études ont confirmé ces effets in

vivo chez des rats et lors d'une étude d'intervention chez 21 sujets sains ayant ingéré des produits laitiers fermentés (KULLISAR *et al*, 2003). Bien que ces hydrolysats fassent preuve d'un potentiel antioxydant, les composants responsables d'une telle activité n'ont pas été identifiés. Il faut ajouter à cela que la démonstration du bénéfice-santé d'une telle voie nécessite de contrôler le potentiel oxydant de ces molécules.

Partie expérimentale

Cette étude a étémenée dans le but de suivre l'évolution de la protéolyse, de la lipolyse au cours de l'affinage ainsi que la recherche d'une éventuelleactivité anti-oxydante des fromages à pâte molle type camembert fabriqué au sein de la laiterie STLD de Tizi-Ouzou.Les analyses physico-chimiques ont été effectuées au sein du laboratoire interne de la laiterie par contre l'autre partie des analyses (dosages : de l'acidité pour les fromages, les protéines, les acides gras libres, les acides aminés libres, l'activité anti-oxydante) a été effectuée au niveau du laboratoire commun de physico-chimie de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

II.1.Présentation de l'unité STLD

La laiterie EURL STLD « société de transformation du lait et dérivés», a été créé le 16 avril2004, c'est une entreprise à caractère privée sise à la rue des frères BEGGAZ, Nouvelle Ville, Tizi-Ouzou. L'unité compte un effectif de 74 employés compétents, ambitieux et qualifiés et bien formés aux pratiques indispensables dans une industrie agro-alimentaire.

La laiterie a pour fonction de produire une large gamme de produits a partir de lait cru collecter par des éleveurs locaux, environ 35000 litres sont transformés par jour. Les produits fabriqués sont :

- ✓ Lait de vache pasteurisé conditionné ;
- ✓ Lait de vache fermenté et pasteurisé « l'ben » ;
- ✓ Camembert au lait de vache « le fermier » ;
- ✓ Camembert au lait de chèvre « le chèvre fermier » ;
- ✓ Fromage à pate pressée «le fermier ».

❖ **Les compartiments de l'unité**

- ✓ Service administratif;
- ✓ service commercial;
- ✓ salle de réception des collectes de lait ;
- ✓ laboratoire d'analyses microbiologiques et physicochimiques ;
- ✓ salle de pasteurisation ;
- ✓ atelier de production ;
- ✓ atelier de conditionnement ;
- ✓ atelier d'emballage ;
- ✓ magasin de stockage ;
- ✓ salle de nettoyage et de désinfection du matériel de production ;
- ✓ cantine.

II.2.Matériel et méthodes

II .2.1.Echantillonnage

- **Plan d'échantillonnage**

Pour les besoins de cette étude expérimentale, des prélèvements ont été effectués à différents stades de production du camembert au lait de vache.

03 échantillons de 3 lots de productionsdifférentes ont été suivis, à raison de 3 répétitions pour chaque échantillon.

Le suivi des points d'échantillonnage est comme suit :

- ✓ A la réception pour l'analyse du lait cru (on a prélevé un échantillon de 5 litres);
- ✓ Au décaillage pour le lactosérum (échantillon de 5 litres);
- ✓ Aux différents stades de l'affinage pour le fromage (J1, J9, J15, J20).

Les 03 lots de productions du camembert au lait de vache qui ont été suivis, sont notés :

- ✓ Echantillon 1 : échantillonde la productiondu Lot1;
- ✓ Echantillon 2 : échantillon de la production du Lot 2;
- ✓ Echantillon 3 :échantillon de la productiondu Lot3.

II .2.2.Processus de fabrication du fromage à pate molle type « camembert » au niveau de laiterie fromagerie STLD de TIZI OUZOU

L'unité de production STLD fabrique le fromage type camembert à partir de lait cru collecter localement, les étapes de transformation du lait en camembert sont illustrées dans la figure 03.

- **Pasteurisation**

Les laits passent dans un pasteurisateur réglé au barème de 78ºc pendant 20 secondes.

- **Maturation**

Cette étape est indispensable pour que le lait puisse atteindre une acidité de 23-24ºD à une température de 38ºc, par l'ensemencement avec des levains lactiques, également pour rétablir l'équilibre salin du lait en ajoutant le chlorure de calcium $CaCl_2$ 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%.

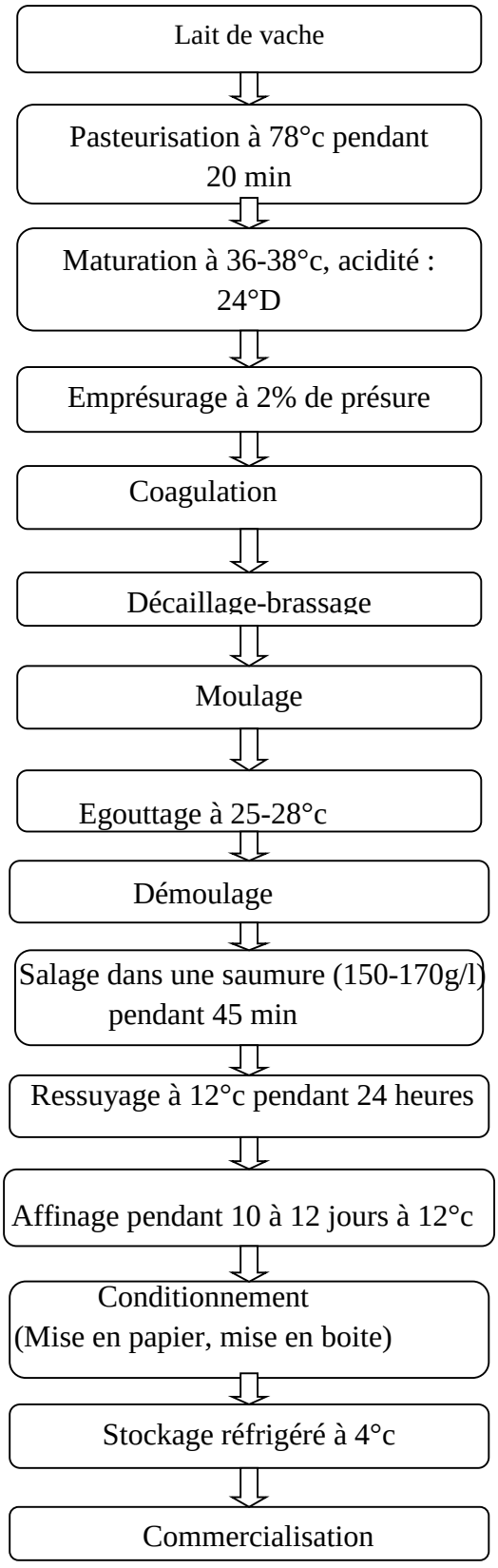

Figure 03: Diagramme de fabrication du camembert au niveau de la laiterie-fromagerie STLD de Tizi-Ouzou.

- **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 retournements 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 au niveau de la laiterie STLD en utilisant des saumures ayant une concentration en sel entre 150 à 170 g/l pendant 35 à 40 minutes.

Après le salage, les fromages sont envoyés dans une salle de ressuyage pour une durée de 24 heures à une température de 12ºc, en effectuant un retournement.

- **Affinage**

Après la durée de ressuyage, les fromages sont introduits dans des hâloirs à une température de 12ºc pendant une durée de 12 jours, durant cette période les fromages sont pulvérisés de *Penicillium camemberti*, en effectuant des retournements tous les deux jours.

II.2.3.Analyses physico-chimiques

II.2.3.1.Détermination du pH

La mesure du pH est déterminée par immersion de l'électrode du pH mètre, dans le lait homogénéisé et directement dans la pate fromagère à 20°c.

II.2.3.2.Détermination de l'acidité titrable

L'acidité est déterminée par le dosage de l'acide lactique à l'aide de l'hydroxyde de sodium à 0,11 mol/l.

La présence de phénolphtaléine, comme indicateur coloré, indique la limite de la neutralisation par le virage de la couleur au rose pâle. Cette acidité est exprimée en degré Dornic (ºD) où : 1ºD représente 0,1g d'acide lactique dans un litre de lait, pour

la détermination de l'acidité du fromage on a utilisé la méthode citée par SAOUDI, 2012 (annexe 01).

II.2.3.3.Détermination de la densité

La densité est déterminée à l'aide d'un thermolactodensimétre étalonné de manière à donner, par simple lecture du trait correspondant au point d'effleurement, la densité de l'échantillon à analyser dans lequel il flotte (annexe 2).

Deux facteurs déterminent cette densité :

- ✓ La concentration des éléments dissous et en suspension ;
- ✓ La proportion de la matière grasse.

II.2.3.4.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 par l'acide sulfurique. Sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction d'une faible quantité d'alcool isoamilyque, la matière grasse se sépare en couche claire dont les graduations des butyromètres en révèlent son taux (annexe 5).

II.2.3.5.Détermination de l'extrait sec total (EST) et de l'extrait sec dégraissé(ESD)

L'extrait sec total est la mesure exprimée en pourcentage pondérale,subsistant après processus de dessiccation à l'infrarouge à une température de 105^{o}c pendant 20 minutes, il est donné par lecture directe sur l'appareil (annexe 3).

L'extrait sec dégraissé (ESD) est calculé comme suite :

ESD=EST-MG

II.2.3.6.Dosage des protéines par la méthode de Bradford et*al*, (1976)

Les protéines sont dosées par l'utilisation de La méthode de Bradford dite méthode spéctrophotométrique, son principe est basé sur la formation d'un complexe coloré entre le bleu de coomassie G250 et les protéines, ce complexe présente une absorption maximale à 595 nm.

L'addition du réactif de Bradford à une solution protéique donne une coloration bleu foncée (annexe 4).

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.

- **Gamme étalon**

La BSA est utilisée pour tracer la courbe DO=f(c)

c : concentration en BSA (mg/ml).

A partir de la solution mère de BSA d'une concentration de2mg/ml, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Volume de la solution mère BSA(ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,2	1
Concentration en BSA (mg/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1

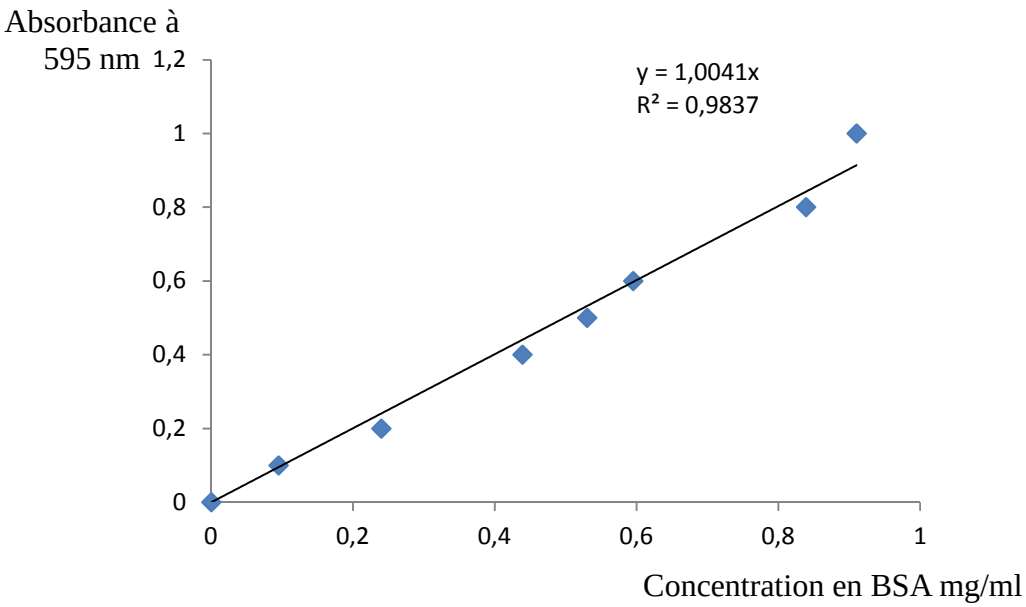

Figure 04: courbe étalon DO=*f* [BSA] pour le dosage des protéines.

- ✓ **Séparation des protéines du fromage**

La matière azoté a été fractionnée en 3 fractions selon leurs comportements vis avis du trichloracétique (TCA) 12% et leurs solubilités au pH_i de 4,6. Ce fractionnement est préparé à partir d'une solution fromagère,préparée selon le protocole de GRIPON *et al* (1976),25 g de fromage (après écroûtage) sontdiluées dans le tampon citrate de sodium (0,5 M, pH=7)puis mise au bain marie à 40°c pendant 30 min, ensuite on élimine la crème après centrifugation à 2500 g /20 min, à partir de la solution fromagère écrémé on prépare des dilutions à 10^{-3} pour effectuer le dosage des protéines totales. Une acidification avec HCl à 4N jusqu'à obtention du pH=4,6, une centrifugation à 5000 g/ 10 à 20 min est effectuée pour récupérer le surnagent (protéines sériques+azote non protéique) culot (caséines), à partir de ce

dernier des dilutions à 10^{-2} sont effectuées pour le dosage des protéines sériques. On ajoute 10 ml de TCA à 12% pour 5 ml du surnageant, après centrifugation on récupère le surnageant pour le dosage de l'azote non protéique,comme le montre la figure 05.

- ✓ **Séparation des protéines du lait et du lactosérum**

La préparation des échantillons de lait et du lactosérum est réalisée de la même manière selon les étapes résumées sur la figure 05, mise à part quelques différences. Le lait ou le lactosérum est centrifugé à 2500g/10min à 4°c, la crème est écartée, des dilutions à 10^{-2} sont effectuées pour le dosage des protéines totales.

Une acidification avec HCl à 4N jusqu'à obtention du pH=4,6, une centrifugation à 5000 g/ 10 à 20 min est effectuée pour récupérer le surnagent, à partir duquel des dilutions à 10^{-1}sont effectuées pour le dosage des protéines sériques. On ajoute 10 ml de TCA à 12% pour 5 ml du surnageant, après centrifugation on récupère le surnageant pour le dosage de l'azote non protéique.

II.2.4.Détermination des paramètres technologiques

- ❖ **Détermination du temps de prise par la méthode chronométrique**

Après emprésurage du lait à la température de 33-34ºc, l'appréciation du temps de prise (temps de floculation), qui est le temps qui s'écoule entre le moment d'emprésurage et celui ou le lait acquiert une viscosité (COLIN, 1990). Cette mesure se fait en introduisant une spatule dans le lait et la soulever doucement.

Lorsque le lait perd sa fluidité pour acquérir une certaine viscosité, l'introduction de la spatule laisse un trait dans le lait, on dit que le lait a pris et on note ce temps en minutes.

- ❖ **Détermination du temps de coagulation**

Le temps de coagulation commence à partir de l'apparition des premiers flocons jusqu'à la formation du coagulum (ALAIS, 1984), le temps de coagulation ou de caillage est apprécié également avec la spatule cette fois si le trait se fragmente après introduction de la spatule, ce temps est également noté en minutes et indique le moment de tranchage du caillé.

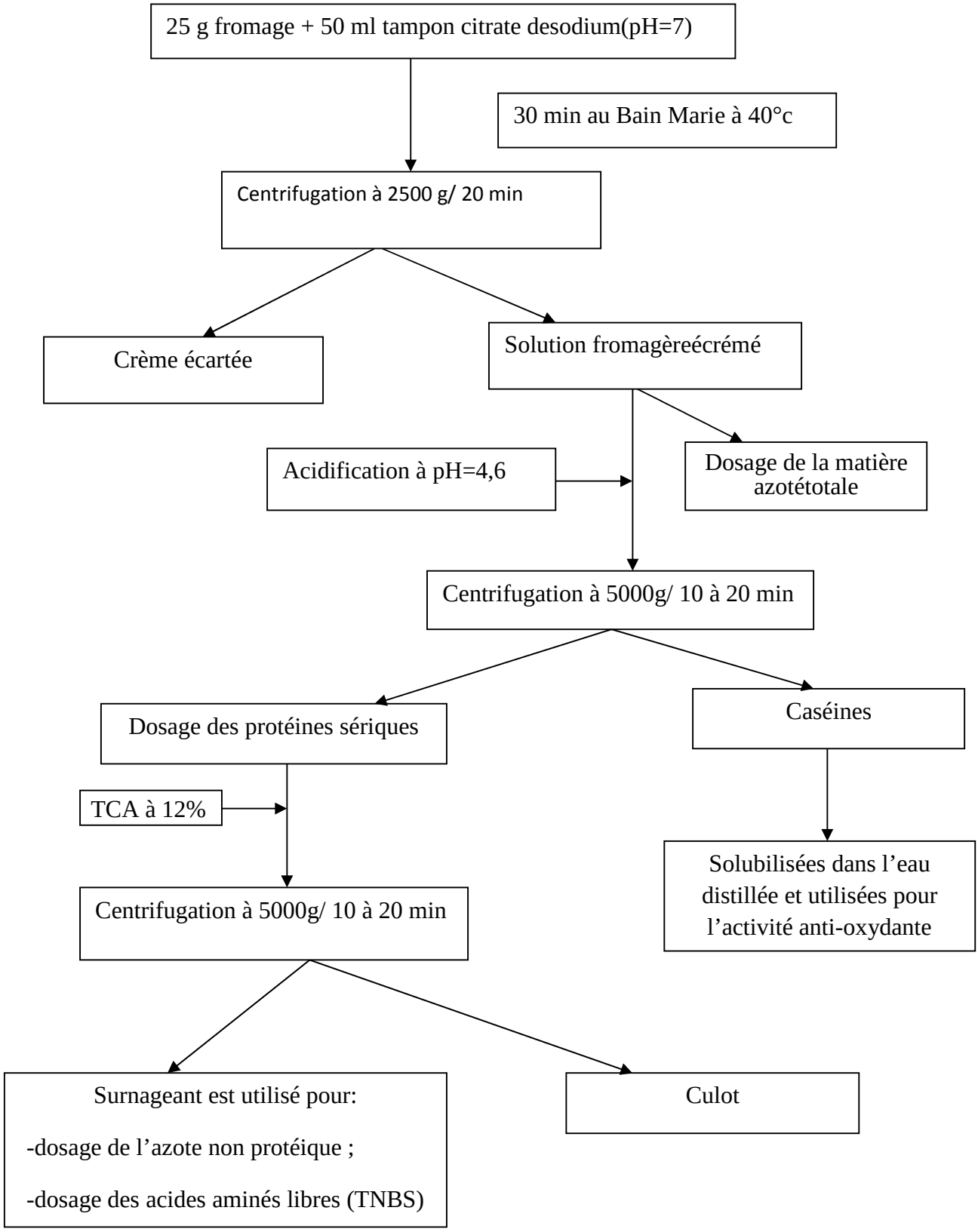

Figure 05: Schéma du protocole d'isolement des protéines sériques à partir du camembert.

II.2.5.Suivi de l'affinage

II.2.5.1.Suivi de la lipolyse

La méthode titrimétrique de DEETH et *al* (1975), permet une assez bonne récupération des acides gras libres (80% environ). Les pertes enregistrées concernant essentiellement les acides gras à courtes chaines.

Le principe de cette méthode est d'extraire la matière grasse du lait et du fromage, comprenant les acides gras libres par le mélange isopropanol-hexane acidifié par H_2SO_4, puis titrer avec du NaOH (0,01N) les acides gras. Le dosage des acides gras libres a été effectué pour les différents niveaux de prélèvement d'échantillons (lait, lactosérum, fromages dans les quatre stades) (voir annexe 07).

L'acidité libre est exprimée en équivalent acide oléique dans 100g de matière grasse en se référantà une courbe d'étalonnage.

La courbe d'étalonnage est tracéegrâce à l'utilisation de l'acide oléique commerciale comme acide gras de référence, la valeur du volume de titration permet par projection sur la courbe de déterminer la concentration des acides gras libres contenus dans l'échantillon utilisé (figure 06).

★ **Gamme étalon**

On a utilisé une solution d'acide Oléique à 600g/l à partir de la on a préparé des solutions filles, puis titré avec du NaOH 0,01N.

Volume de la solution mère (ml)	1	1,33	1,66	3,33	6,66	10
Volume éthanol (ml)	9	8,67	8,34	6,67	3,34	0
[] $\times 10^{-2}$(g/ml)	0,06	0,08	0,1	0,2	0,4	0,6

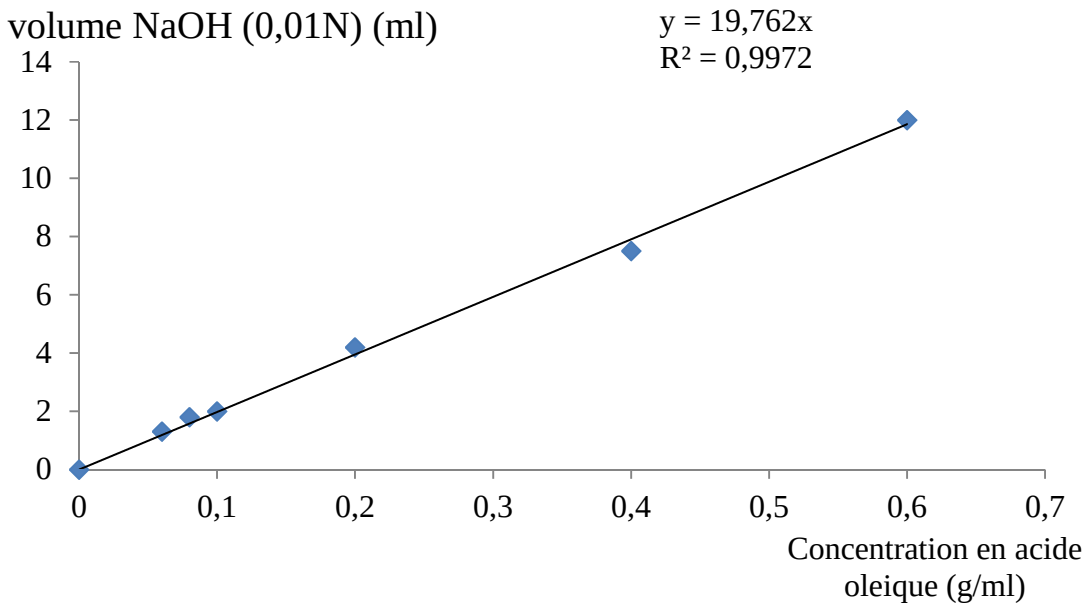

Figure 06 : courbe étalon $V_{NaOH}=f$ [acide oléique] pour le dosage des acides gras libres.

II.2.5.2.Suivi de la protéolyse

- Ledosage des groupements NH_2 libres avec l'emploi de l'acide 2-4-6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS).

Le dosage des groupements NH_2 libres par le TNBS, qui est une méthode spéctrophotométrique adaptée à l'évaluation de la protéolyse lors de la maturation du fromage. En effet, des groupements α-aminés libérés par suite de l'hydrolyse des protéines réagissant avec le TNBS pour donner des complexes trinitrophényles jaunes, qui absorbent massivement à 420nm. Cette réaction se déroulant en milieu basique (et sera donc inhibé par un abaissement de pH).Il existe une relation linéaire entre l'intensité de la réaction et laconcentration en groupements α-aminés existant (ADLER et NISSEN, 1979).

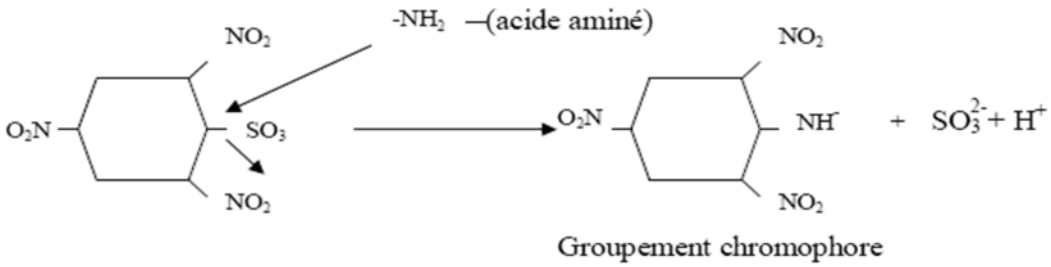

Figure 07: réaction de déroulant entre l'acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique et un acide aminé.

On a utilisé la méthode de BOUTON et *al*, (1993) telle qu'elle a été optimisée par POLYCHRONIADOU (1988), sauf que pour la dilution de la prise d'essai, on a pris 1/25 de la solution fromagère. La réaction se développe en présence de 0,5 ml de la dilution précitée, auquel on a ajouté 0,5 ml du tampon borate (pH= 9,5) et 1 ml de la solution aqueuse à 0,1% du réactif TNBS. Le mélange est incubéà 37°c pendant 1 heure. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution phosphate/sulfite (annexe06).

Une courbe d'étalonnage a été tracée grâce à l'utilisation de la glycine comme acide aminé de référence. La valeur de la densité optique donnée par le spectrophotomètre permet par projection sur la courbe d'étalonnage de déterminer la concentration en amines libres de l'échantillon utilisé (figure 08).

★ **Gammeétalon**

La glycine (0,5mM) est utilisée pour tracer la courbe DO=f(c)

C : concentration en glycine (mM/l).

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

Volume de la solution mère de glycine (0,5mM)	0	0,2	0,4	1	1,4	2	4	6	8	10
Volume d'eau distillée (ml)	10	9,8	9,6	9	8,6	8	6	4	2	0
[ ] (mM/l)	0	0,01	0,02	0,05	0,08	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

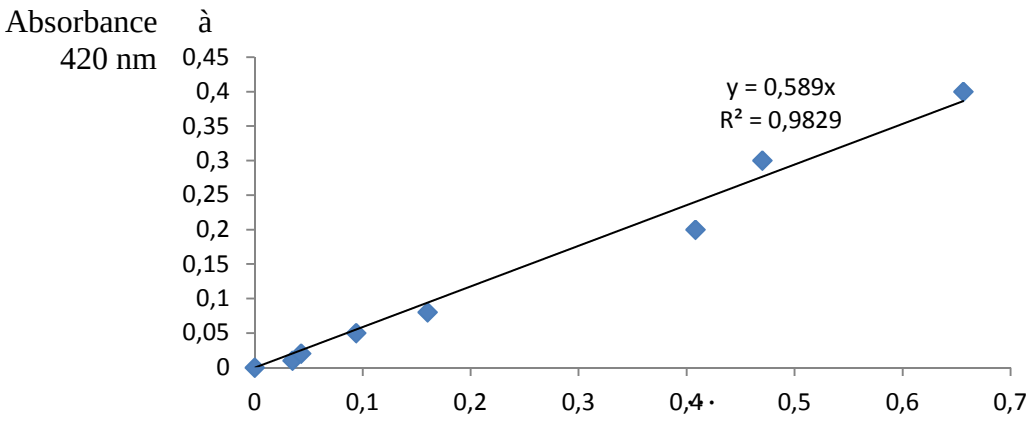

Figure 08:Courbe étalon DO=*f* [glycine] pour le dosage des acides aminés.

- **Taux de maturation**

Le taux de maturation, a été défini par le rapport azote soluble/ azote total. L'azote soluble est déterminé par le dosage des protéines sériques après leur isolement et séparation à partir des protéines totales (DALLES et *al*, 1983).

II.2.5.3.Suivi de l'activité anti-oxydante

Au cours de la fermentation, les protéines sont dégradées par les protéases et la présure naturellement présentes dans le lait ainsi que par les protéinases et les peptidases de microorganismes protéolytiques. Au cours de ce processus, il y a formation de peptides bioactifs.Ces derniersont plusieurs effets, parmi eux l'activité anti-oxydante(WALTHER,2006).

Il existe plusieurs protocoles de dosage mesurant l'activité anti-oxydante :

- par piégeage des radicaux libres, c'est-à-dire l'activité anti-radicalaire ;
- blanchissement du β-carotène ;
- peroxydation de l'acide linoléique ;
- pouvoir réducteur ;
- la chélation des ions Fe^{2+} (DENES, 2006 ; BENBRINIS, 2012).

Dans le but de rechercher l'activité anti-oxydante, nous avons opté pour deux méthodes (le pouvoir chélateur, anti-radicalaire). La recherche de cette activité a concerné les différentes fractions de protéines du lait et du fromage à différents stades d'affinage (protéines sériques, azote non protéique, caséines).

✓ Pouvoir chélateur

Pour la recherche de l'activité anti-oxydante nous avons utilisé la méthode de (WU, CHEN, & SCHIAU, 2003), le principe de cette méthode est basé sur le test de la chélation des ions Fe^{2+}, il met en avant la capacité d'une molécule à fixer ces ions.

Les ions Fe^{2+} jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres notamment lors de la réaction de Fenton, qui survient à chaque fois qu'une molécule d'H_20_2 est en contact d'ions Fe^{2+} et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyl (OH), un des radicaux les plus réactifs (DENES, 2006).

Le fer joue aussi un rôle dans la phase de propagation de la lipoperoxydation ainsi que dans la formation du radical O_2. L'expression des résultats est effectuéegrâce à un spectrophotomètre. L'absorption est faite à 700nm (annexe 8).

✓ Activité anti-radicalaire

Pour la recherche de l'activité anti radicalaire on autilisé la méthode de (YANGCHAO et *al*,2014), quiconsiste à utiliser le DPPHcomme un radical libre qui se caractérise par une couleur violet, au contact d'un antioxydant, le DPPHest réduit, cette réduction est caractérisée par un virage de la couleur du violet vers le jaune qui absorbe à 517 nm.

Le test au DPPH, est rapide, facile à mettre en œuvre, s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules testées (annexe 8).

Expression des résultats

Le pourcentage de l'activité est mesuré par l'utilisation de la formule suivante :

$$\%\ \text{inhibition} = \frac{\text{Acontol} - \text{Asimple}}{\text{Acontrole}} \times 100$$

Le control est préparé par l'utilisation d'eau distillée à la place de l'échantillon.

$A_{control}$: absorbance du DPPH ;

A_{simple} : absorbance de l'échantillon analysé.

II.2.6.Analyse statistique des résultats

Les résultats des mesures du suivi de l'affinage obtenus dans cette étude sont soumis à une analyse statistique avec le logiciel STAT box 6,4 afin de montrer les degrés de signification des donnéesà la probabilité (p-value) de $p< 0,05$.

Si la probabilité p est :

- ✓ $p>0,05$:les variables montrent une différence non significative.
- ✓ $p\leq 0,05$: les variables montrent une différence significative.
- ✓ $p\leq 0,01$: lesvariables montrent une différence hautement significative.
- ✓ $p\leq 0,001$: les variables montrent une différence très hautement significative.

L'analyse statistique a été effectuée pour l'étude des quatre stades d'affinages, l'étude a été faite à un facteur qui est le stade d'affinage avec quatre niveaux qui sont le 1er jour, 9eme jour, 15eme jour et 20eme jour (annexe 09).

III.Résultats et discussions

III.1.Résultats des analyses physico-chimiques du lait

Les résultats des analyses physico-chimiques des laits utilisés pour la production des 3 lots de camembert, sont représentés dans le tableau suivant

TableauVI : Valeurs moyennes des analyses physico-chimiques du lait

Paramètres	Lait de vache	Normes FIL-AFNOR (1980)
pH à 20°c	6,1±0,1	6 ,6-6,8
MG (g/l)	32,5±0,7	34-36
Densité	1,027±0,0006	1,028-1,032
EST (g/l)	110,8±1,22	102 – 125
ESD (g/l)	78,46±1,80	87,5 – 89,9
Protéines (g/l)	27,56±0,4	34 – 36
Acidité (°D)	18±1,73	16-18
AGL (équivalent acide oléique/100g)	0,033±0,01	/
AAL (mM équivalent glycine)	0,071±0,038	/

MG : matière grasse ; EST : extrait sec total ; ESD : extrait sec dégraissé ; AGL : acide gras libre ; AAL : acide amine libre.

- ✓ **L'acidité**

Les valeurs obtenues pour la mesure de l'acidité du lait sont des valeurs répondant à la limite d'acceptation définie par l'AFNOR et qui est de 18°D.

Toute augmentation de l'acidité, traduit une mauvaise conservation ou un mauvais transport du lait. La rupture de la chaine de froid induit le développement de la flore lactique. L'acidité élevée d'un lait est attribuée à sa richesse en constituants à caractères acides tel que l'acide lactiques et anions phosphates, l'élévation de l'acidité s'accompagne d'un abaissement du pH du lait (VIGNOLA, 2002).

D'après HEINLEIN et CACCESE (2006), le mouillage du lait provoque une diminution de l'acidité.

- ✓ **L'EST**

La mesure de l'EST a révélé une moyenne de 110,8g/l cette teneur correspond à la norme qui est de 102 – 125 g/l.

Selon MARTIN et COULON (1995), l'ingestion de quantités importantes de fourrages d'aliments concentrés par les vaches laitières entraine une

augmentation de la production du lait et aussi une augmentation du taux de MG et des protéines ce qui induit un accroissement du taux d'EST du lait de vache.

- ✓ **La densité**

Dans notre étude, la valeur moyenne de la densité est de 1,02, ces résultats concordent avec ceux trouvés par BOUBEZARI (2010).

Ce paramètre est très recherché en industrie car il permet la détection des fraudes**,** le mouillage abaisse la teneur du lait en ses divers constituants, entrainant ainsi des modifications de ses constantes physiques.

La valeur supérieure de la densité est due à l'élévation du taux d'extrait sec du lait qui conduit à l'augmentation de la masse du même volume de lait (MATHIEU, 1998).

- ✓ **La matière grasse**

Critère relativement variable d'un jour à l'autre, car il est fortement lié à la traite. Cependant, il est parmi les solides du lait, l'élément qui est le plus fortement et le plus rapidement modifiable par l'alimentation (HODEN et COULON, 1991).

La valeur moyenne trouvée dans notre étudeest de 32,5g/l cette valeur un peu faible est peut êtredueà l'alimentation de la vache, ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par MEKROUD (2010) qui a confirmé la variation du taux butyreux (TB) selon la période de lactation et la saison de la traite du lait.

- ✓ **Le taux de protéines**

La teneur en protéines du lait et les caractéristiques de ces protéines sont des facteurs prépondérants du rendement fromager (REMEUF *et al* 1989 ; VERTES *et al* 1989 ; GAREL et COULON 1990).

Dans notre étude nous avons trouvé une moyenne de27,56 g/l cette valeur est faible par rapport à la norme requise qui est de 34-36 g/l, (courbe étalon annexe 04). La teneur en matière grasse des laits de vache est fortement corrélée à la teneur en protéines (CROGUENNEC *et al*, 2008)

MARTIN et COULON (1995) notent que beaucoup de facteurs sont susceptibles d'influer négativement sur le taux protéique des laits. Outre l'alimentation quotidienne déficiente en fourrages et plantes herbacées, il y a lieu de citer l'effet de la race, l'âge, le stade de lactation, la saison et le climat etc. Le premier facteur semble néanmoins prépondérant dans l'obtention de ces teneurs faibles.

Selon DEBRY (2001), généralement les races les plus laitiers présentent un plus faible taux de matière grasse et protéique.

- ✓ **Le taux d'acides gras libres**

Dans notre étude nous avons noté une moyenne de 0,033 équivalent acide oléique/100g de matière grasse (annexe 07).

La matière grasse du lait fraîchement sécrété est constituée pour 98 % de triglycérides (CHILLIARD et LAMBERET, 1984).

Le lait contient aussi de très faibles taux d'acides gras libres (<1 mM équivalent acide oléique/litre). Leur présence donnent au lait une saveur de rance quand, sous l'effet d'une lipolyse spontanée, leur taux dépasse 2 mM équivalent acide oléique/litre **(**COURTET LEYMARIOS, 2010).

- ✓ **Taux d'acides aminés libres**

Les protéines sont constituées soit d'acides aminés seulement (ß-lactoglobulines, α-lactalbumine), soit d'acides aminés et d'acide phosphorique (caséines α et ß) avec parfois encore une partie glucidique (caséine k) (COURTET LEYMARIOS, 2010).

Nous avons trouvé une moyenne de 0,071 mM glycine (courbe étalon figure 02 dans l'annexe 06). La présence de deux enzymes associées à la micelle de caséine mais également à la membrane du globule gras est bien établie.les protéases dégradent les protéines avec la formation de protéoses peptones, de peptides et d'acides amines (DEBRY, 2001).

III.2.Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum

Les résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum prélevé sur les 3 lots de productions de camembert au lait de vache sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau VII: Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum récupéré dans les 3 productions

Paramètres	Lactosérum
pH à 20°c	6,46±0,15
Densité	1,022±0,0003
MG (g/l)	3,33±0,57
Acidité(°D)	13±1
EST (g/l)	63,3±1,21
ESD (g/l)	59,96±0,64
Protéines(g/l)	4,07±0,72
AGL (équivalent acide oléique/100g)	0,036±0,012
AAL (mM glycine)	1,63±0,04

La mesure de la teneur en MG du lactosérum est faible, la valeur moyenne est de 3,33 g/l, ceci peut être dû au fait que le caillé est une façon deconserver les éléments essentielle du lait à savoir les protéines et la matière grasse (JEANTET *et al*, 2007).En effet la teneur moyenne des protéines du lactosérum est de 4,07g/l, elle représente essentiellement les protéines solubles. Le lactosérum est un produit très dilué ne contenant que 6,5 % de solides totaux (BOIVIN-PICHE, 2014).

En comparent la teneur en AGL du lait et du lactosérum, il apparait bien clair que le lactosérum est plus riche en AGL, ceci peut être expliqué par le fait que la lipolyse dans le lait est principalement due auxbactéries lactiques, l'activité de ces dernières et liéeà l'acidité du lait, lors de la maturation l'activité lipolytique s'accentue grâceà l'action des ferments ajoutées (GOBBETTI *et al*, 1999 ; ST-GELAIS et TIRARD-COLLET, 2002).

Selon THEODET et GANDEMER (1990) l'extraction des acides gras du lactosérum est difficile vu sa faible teneur en lipides et l'existence de complexes lipides-protéines stables dans les concentrés lipoprotéiques, sans oublier l'influence de la méthode d'extraction utilisée.

Le taux d'AAL est très élevé au niveau du lactosérum qu'au niveau du lait, ceci est dû au faible degré de protéolyse au niveau du lait qui est dû essentiellement à l'activité des micro-organismes et de protéases naturellement présentent dans le lait (DEBRY, 2001).

III.3.Résultats des analyses physico-chimiques du fromage

Les fromages analysés étaient de bonne qualité par rapport aux normes codex pour le camembert, homogènes, sans défauts de croûte ou de pate, de gout agréable. La variation des caractères physico-chimiques participent à la modification des caractères intrinsèques du produit fini.

Les moyennes des paramètres physico-chimiques des fromages à différents stades d'affinages obtenues sont rapportées dans le tableau suivant.

TableauVIII : Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'affinage du camembert.

Paramètres	**Stades d'affinage**			
	J=1	J+9	J+15	J+20
pH à 20°c	5,3±0,2	5,6±0,1	5,7±0,081	5,76±0,057
Acidité (%)	9,90±0,72	8,64±1,24	6,84±0,69	6,30±0,87
EST (g/100g)	42,76±0,25	43,53±0,52	46,39±0,34	49,97±0,068
ESD (g/100g)	19,76±0,92	21,53±0,77	22,72±0,75	24,31±0,60
MG (%)	23±1	22±1	23,66±0,57	25,66±0,57

✓ **Variation de l'acidité et du pH**

D'après le graphe, on remarque que le pH et l'acidité évoluent inversement c'est-à-dire plus le pH augmente l'acidité diminue. Cette évolution continue au fil du temps.La diminution de l'acidité peut être due à la formation du *Penicillium* car selon LENOIR (1963) ces moisissures consomment l'acide lactique et désacidifient la pâte.

En se développant, les bactéries lactiques forment de l'acide lactique par fermentation des traces de lactose (VIGNOLA, 2002).

Il ya une différence hautement significative entre les différents stades d'affinage pour les deux paramètres et ceci est confirmé par l'analyse de la variance qui donne une valeur de probabilité très faible de l'ordre de 0,00015 pour la mesure du pH et 0,01079 pour la mesure de l'acidité par rapport à α=0,05 (annexe 09 : tableau : 06,07).

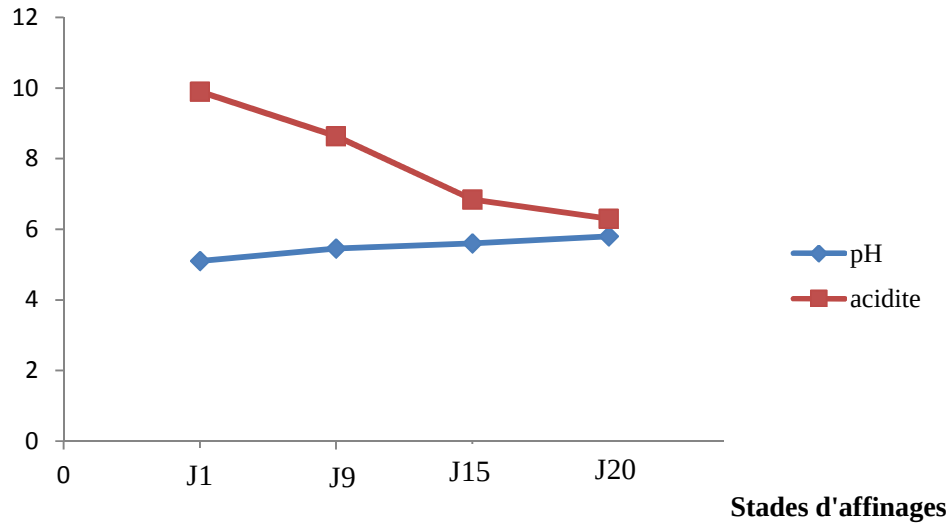

Figure 09 : évolution du pH et de l'acidité des fromages au cours de différents stades d'affinage

✓ **Variation de l'EST et de la matière grasse**

On remarque que les teneurs en EST et MG augmentent au cours de l'affinage, ces résultats s'expliquent par le fait que les constituants de la matièresèche essentiellement la MG et les protéines se concentrent au cours de l'affinage.

L'humiditérelative agit indirectement sur la teneur en matière sèche au cœur du fromage (RIAHI, 2006).

Selon VASSAL *et al* (1986), le taux de matière grasse et corrélé à l'extrait sec.

Ceci est confirmé par l'analyse de la variance, qui nous donne une différence très hautement significative pour les deux paramètres l'EST et MG avec une p-value de 0 et 0,0038 respectivement (annexe 09 : tableau 02, 04).

III.4.Résultats des mesures des paramètres technologiques

Les résultats des mesures du temps de coagulation et du temps de prise sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau IX : Résultats des mesures du temps de prise et de coagulation du lait de vache au cours de la fabrication du camembert.

	L1	**L2**	**L3**	**Moyenne**
Temps de prise (en minutes)	10	11	11	10,66±0,57
Temps de coagulation (en minutes)	30	33	33	32 ±1,73

On remarque à travers les résultats obtenus que le temps de prise du lait des trois lots de productions est différent, cela peut être attribué à la différence du taux d'acidité, cette dernière influe sur l'action de la présure (VEINOGLOU *et al*, 1989). En effet selon VASSAL *et al* (1986), le pH influence sur l'activité de la présure, qui est maximal à pH=5,5 et sur la stabilité des micelles qui décroit avec le pH, par neutralisation des charges négatives et libération des ions ca^{2+}, qui migrent vers le lactosérum.

Les résultats de la mesure du temps de coagulationobtenus, révèlent une valeur moyenne de 32 minutes, ces résultats montrent bien que pour un temps de prise court correspond un temps de coagulation court et inversement.

Selon NOOMEN (1978), le pH influence sur la texture des fromages à pate molle, la coagulation d'un lait est corrélée à son acidité.

III.5.Résultats du suivi de l'affinage des fromages

Dans le but d'étudier l'évolution de la lipolyse et protéolyse et les activités biologiques, on s'est intéressés à l'évolution des acides gras libres, les acides aminés libres, et l'activité anti-oxydante dans les différentes fractions protéiques au cours de l'affinage des fromages.

Les moyennes des résultats du suivi de l'affinage des 3 lots de productions de camembert sont représentées dans le tableau suivant.

TableauX : Evolution des moyennes des paramètres d'affinages.

Paramètres		**Stades d'affinages**			
		J 1	J9	J15	J20
Protéines totales (%)		12,05±0,53	14,6±0,7	16±0,8	17,5±0,7
AAL (mM d'équivalent glycine/100g d'EST)		0,62±0,01	0,64±0,005	0,68±0,01	0,7±0,01
AGL(mM d'équivalent /100g)		0,13±0,01	0,49±0,04	0,6±0,2	0,83±0,07
PS	Taux de PS	0,59±0,02	0,67±0,01	1,09±0,01	2,88±0,77
	Activité anti-rad	60,92±0,38	65,13±0,32	70,19±0,2	93,23±0,32
	Pouvoir chélateur	0,03±0,001	0,033±0,001	0,035±0,0012	0,056±0,002
ANP	Taux d'ANP	0,028±0,002	0,026±0,015	0,033±0,015	0,04±0,029
	Activité anti-rad	54,15±0,14	60,06±0,2	68,48±0,44	82,09±0,17
	Pouvoir chélateur	0,018±0,002	0,08±0,001	0,085±0,002	0,098±0,001
Caséines	Activité anti-rad	28,74±0,23	46,83±0,2	73,23±0,49	76,64±0,55
	Pouvoir chélateur	0,053±0,001	0,056±0,001	0,062±0,002	0,22±0,001

AAL : acides aminés libres ; AGL : acides gras libres ; PS : protéines sériques ; ANP : azote non protéique ; activité anti-rad : activité anti radicalaire.

III.5.1.Suivi de la lipolyse

Le dosage des acides gras libres permet de suivre leurs évolutions le long de la phase d'affinage pour le camembert. Les moyennes obtenues des taux d'acides gras libres sont représentées dans le graphe suivant.

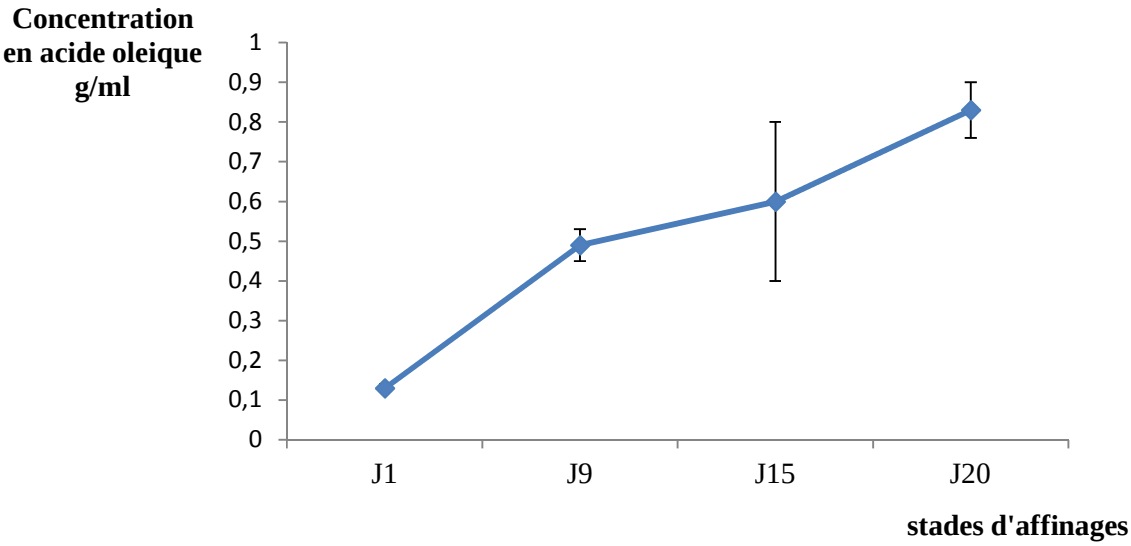

Figure 09 : Evolution des taux d'acides gras libres au cours de l'affinage.

La courbe montre une évolution progressive des taux d'acides gras libres au fur et à mesure que le stade d'affinage se prolonge. L'analyse statistique affirme qu'il ya une différence trèshautement significative entre les différents stades d'affinage et ceci avec une p-value de 0,00044 (annexe 09 : tableau 17).

Les teneurs en acides gras libres ne représentent pas exactement le degré d'hydrolyse de la matière grasse seule, en effet les acides gras à nombres de carbones supérieur ou égaleà six ont pour unique origine la lipolyse. Les acides gras à courte chaine ramifiée (C4 à C5) résultent de l'action des micro-organismes sur les acides aminés et sur le lactose. Pour le camembert, KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, (1982) estiment que 5% des acides gras libres totaux ne proviennent pas de la lipolyse.

La flaveur des fromages est due à la combinaison des produits de dégradation du lait. La matière grasse du lait peut être la source la plus importante de la flaveur (NADJERA *et al*, 1994). En effet, elle fournit les acides gras qui servent de précurseurs pour une variété de compositions responsables de la flaveur tels que les alcools, les esters, les cétones, les aldéhydes, les lactones, etc (DESNOUVEAUX *et al*, 1986).

Un fromage affiné contient toujours un certain taux d'acides gras libres volatils et non volatils ; l'origine de ces acides est multiple :

-Fermentation du lactose ;

-Transformations des acides aminés résultant de la dégradation des protéines du lait, lipolyse.

Les acides gras à courte chaine ramifiée (C4 à C5) résulteraient de l'action des micro-organismes sur les acides aminés et sur le lactose (KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1967).

Le camembert se situe parmi les fromages gras dont la matière grasse est la plus dégradée (ECK, 1990). Pour le camembert Normand, le taux d'hydrolyse est voisin de 10 à 15%. Toutefois, ce taux n'est pas homogène, il est beaucoup plus intense sous la croute qu'au cœur du produit (CERNING *et al*, 1987).

L'hydrolyse des triglycérides se produit de manière assez peu spécifique. La répartition des acides gras libres est assez similaire à la répartition des acides gras estérifiés. Cependant quelques écarts dans les rapports entre les différents acides gras libres peuvent être observés en particulier pour le camembert où la proportion en acide oléique libre est légèrement dominante (MOLIMARD *et al*, 1997). En effet selon Bertrand (1988), *Geotricum candidum* possède une lipase neutre qui a la propriété de libérer préférentiellement l'acide oléique, par ces activités biochimiques variées, cette moisissure contribue à la formation de la saveur et de l'arome caractéristiques mais un développement trop important peut être à l'origine de défauts, d'aspects et de gout.

Les profils d'acides gras à courtes chaines sont souvent la marque de l'action spécifique des flores microbiennes propres àchaque type de fromage.

Dans le camembert, où l'action des moisissures domine, le taux d'acides gras volatils est relativement faible. Il ne dépasseguère 5% des acides gras libres totaux (LENOIR*etal*, 1983 ;MOLIMARD et SPINNLER, 1996). Les acides gras libres issus de la lipolyse sont des précurseurs des méthyles-cétones, des lactones, des alcools et des esters. En effet, les micro-organismes peuvent utiliser les acides gras comme source de carbone mais en général, les quantités d'acides prélevées sont faibles au regard de la lipolyse. Les principales modifications des acides gras dans les fromages sont la réesterification et la dégradation oxydative (ECK, 1990).

Dans les fromages, les micro-organismes principalement impliqués dans la formation d'ester sont les levures. *Geotrichum candidum* est également susceptible de produire des esters. Les plus communs des esters sont les acétates formés à partir d'acétylcoenzyme A et d'éthanol. La dégradation oxydative est à l'origine de la formation des méthyles-cétones et des alcools secondaires. Les précurseursdes méthyles cétones sont les acides gras saturés à chaine courte et moyenne (CERNING et *al*, 1987).

III.5.2.Suivi de la protéolyse

- **Taux de maturation**

Le taux de maturation permet aussi de suivre la dégradation des protéines au cours de la phase d'affinage. Les valeurs enregistrées pour ce paramètre sont représentées dans le tableau XI.

Tableau XI : Les résultats du taux de maturation des fromages au cours de l'affinage.

Stades d'affinages	**J 1**	**J9**	**J15**	**J20**
Taux de maturation du camembert en %	12,05	14,6	16	17,5

Les résultats montrent que le taux de maturation, augmente d'une façon significative jusqu'au 9eme jour puis il atteint son seuil maximum ceci est confirmé par l'analyse de la variance qui donne une p-value égal à 0,00012 (annexe 09 : tableau 09).

- **Le dosage des amines libres**

Les résultatsobtenus avec la méthode de TNBS pour le dosage d'acides aminés libres pour le camembert sont représentés dans le tableau X, la méthode de TNBS permet d'avoir une idée sur la cinétique de l'évolution de la protéolyse pour les fromages. Les taux d'acides aminés libres augmententau cours de l'affinage. L'analyse de la variance confirme qu'il ya une différencetrès hautement significative avec une probabilité de 0,00005 (annexe 09 : tableau15).

Mathieu *et al* (1977), mettent en évidence, la présence dominante de certains acides aminés, notamment celle de l'acide glutamique, de la lysine et de la leucine qui, ensemble en fin d'affinage, constituent environ 45% des aminoacides totaux. Il est à remarquer que les pourcentages des acides aminés du fromage le 1er jour peuvent être sensiblement différents de ceux révélés le 20eme jour. Ainsi, les proportions relatives d'acides glutamique, d'alanine, de valine d'isoleucine augmentent au cours de l'affinage ; en revanche celles de thréonine, de serine de proline et de tyrosine diminuent. Ces différences peuvent être dues aux dégradations secondaires des acides aminés, comme par exemple la décarboxylation dans le cas de la tyrosine ou la désamination dans celui de la serine. Elles peuvent aussi s'expliquer par une libérationpréférentielle lors de la protéolyse, par une production à partir des micro-organismes, excrétion ou lyse microbienne, ou par des réactions de transamination.

En étudiant un fromage blanc à pate molle KAPAC-PARKACEVA *et al* (1974), ont remarqué que la plus grande concentration d'acides aminés libres s'effectue entre 15 et 30 jours suivie d'une diminution de leur quantitéjusqu'au 60eme jour que dure l'étude du fromage.

Les références bibliographiques mentionnent que la présure est le premier agent de la protéolyse dans le fromage. Elle attaquepréférentiellement la caséine αS1 en scindant la liaison (Phe23-Phe24), puis elle hydrolyse la caséine β, cette

dernièrenéanmoins plus sensible à l'action de la plasmine. Après cette hydrolyse primaire qui est à l'origine, en général, de peptides de haut poids moléculaire, C'est le tour des protéoses bactériennes et fongiques d'enclencher la protéolyse secondaire (BERTRAND, 1988). En effet, les différences dans la composition et l'évolution de la microflore de la surface et de l'intérieur du Camembert ne sont pas sans rapports avec le caractère centripète de la protéolyse. Si la dégradation des protides est plus rapide et plus profonde à la partie superficielle du fromage, plusieurs facteurs en sont causés ; outre qu'en surface l'évolution du pH est plus favorable à l'action des enzymes protéolytiques et la sécrétion des protéinases d'origine fongique plus active (LENOIR, 1963).

III.5.Résultats du suivi des activités biologiques

Dans notre étude, nous avons essayé de mettre en relief l'activitéanti-oxydante dans les différentes fractions de protéines dans les laits et les fromages par l'utilisation de deux méthodes : pouvoir chélateur et activité anti-radicalaire. Les résultatsobtenus sont représentés ci-dessus.

- **Pour les laits**

Les résultats de l'activité anti-oxydante dans les différentes fractions de protéines des laits sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau XII : Résultats des activités anti-oxydantes et anti-radicalaires des différentes fractions des protéines des laits.

Activités	**Fractions**	**L1**	**L2**	**L3**
Activité anti-radicalaire	PS	55,47	38,55	85,90
	Caséines	10,28	51,07	6,13
Pouvoir chélateur	PS	0,016	0,021	0,013
	Caséines	0,038	0,034	0,034

- **Pour le fromage**

L'activité anti oxydante est mise en relief par l'utilisation de la méthode de (WU, CHEN, & SCHIAU, 2003) avec quelques modifications concernant la prise d'essai (annexe 08), sur les différentes fractions de protéines des fromages les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11.

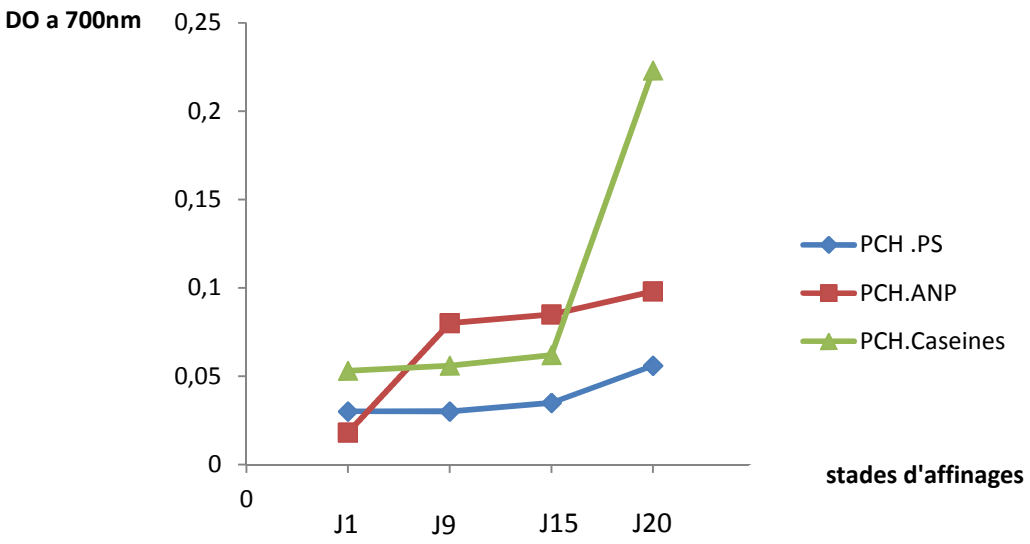

Figure 11: Evolution du pouvoir chélateur dans les différentes fractions de protéines des fromages au cours de l'affinage.

PCH.PS : pouvoir chélateur des protéines sériques ; **PCH. ANP** : pouvoir chélateur de l'azote non protéique ; **PCH. Caséines** : pouvoir chélateur des caséines.

Pour la recherche de l'activité anti-radicalaire, nous avons opté pour la méthode de(YANGCHAO et *al*,2014) avec quelques modifications (annexe 08), cette dernière consiste en l'utilisation d'un radical libre qui est le DPPH. Les résultats obtenus dans les différentes fractions des protéines de fromages sont représentés dans la figure 12.

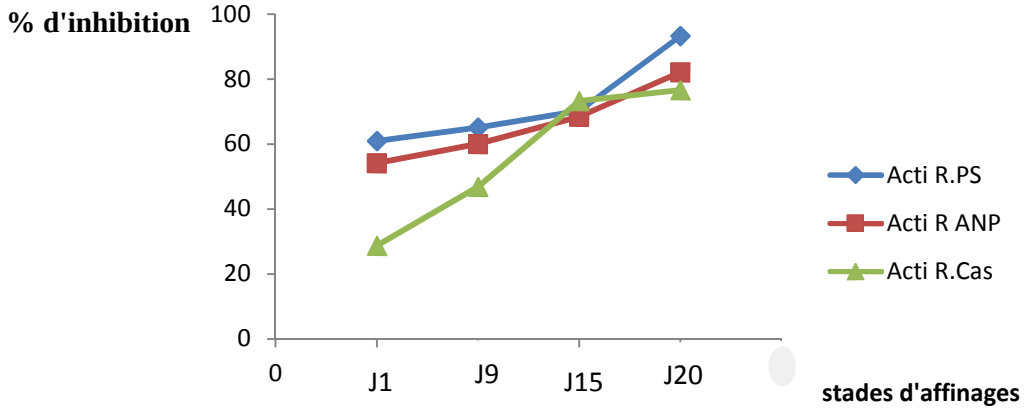

Figure 12: Evolution de l'activité anti radicalaire dans les différentes fractions de protéines des fromages au cours de l'affinage.

Acti R.PS : activité anti-radicalaire des protéines sériques ; **Acti R.ANP :** activité anti radicalaire de l'azote non protéique ; **Acti R. caséines :** activité anti-radicalaire des caséines.

Selon BELKAALOUL *et al*, (2014), une hydrolyse des caséines etdes protéines du lactosérum (β-*Lg*) a été obtenue après 48 h de fermentation par *Lactobacillus paracaseii*. La capacité anti-oxydante des fractions peptidiqueslibérées est significativement plus élevéeque celle du lait de vache au départ.

En effet, dans notre étude, on a remarqué une augmentation de l'activité entre le lait et le fromage, mais aussi entre les différents stades d'affinages.

Les caséines lactiques sont présentes sous forme de micelles contenant notamment des phosphates. Les micelles de caséine se lient au fer alimentaire via ces phosphates. Cette association protège l'organisme en prévenant des taux d'absorption et des concentrations élevées de fer, auquel on attribue le rôle de facteur déclencheur de la formation des DRO(DOREEN ,2011).

En comparent les résultats de l'activité anti-oxydante et anti-radicalaire dans les différentes fractions protéiques on remarque que quel que soit la méthode utilisée, l'intensité de l'activité ne change pas et cela peut être dû à la teneur en caséines. Selon COUILLARD *et al*, (2014) la capacité anti-oxydante des laits est proportionnelle à la teneuren protéine et plus spécifiquement en caséines.

Selon SALAMI *et al*, (2010) les protéines doivent leurs activités anti-oxydantes à la présence de certains acides aminés dans leur structure primaire. A partir de nos résultats en remarque que l'activité anti-oxydante est présente dans les différentes fractions des protéines de fromages et elle augmente au cours de l'affinage mais à des taux différents.Ceci peut être dûà la libération d'AAL grâce à la protéolyse au cours de l'affinage.

En effet selon BLANDRAS (2008) ces peptides inactifs lorsqu'ils sont encore inclus dans la séquence de la protéine dont ils sont issus, peuvent être libérés par protéolyse.Après dégradation des séquences protéiques du lait par les protéases microbiennes ou par des enzymes végétales, des peptides bioactifs peuvent être libérés BELAKAALOUL, (2015).

Il est aujourd'hui incontesté qu'en plus d'une valeur nutritive, les protéines ont des propriétés fonctionnelles et biologiques, ces dernières peuvent être influencées par des procédés technologiques. Au cours de la fermentation, les protéines sont dégradées par les protéases et la présure naturellement présentes dans le lait ainsi que par les protéinases et les peptidases de microorganismes protéolytiques. Au cours de ce dernier processus, il ya formation de peptides bioactifs, ces peptides déploient plusieurs activités (WALTHER, 2006 ; YANGCHAO *et al*, 2014). En effet ceci est confirmé par l'analyse statistique qui affirme qu'il ya une différence très hautement significative entre les différents stades d'affinages (annexe 09).

Conclusion

Conclusion

Cette étude a mis en évidence les principales caractéristiques physico-chimiques du lait de vache, ainsi que la caractérisation de l'évolution, au cours de l'affinage de la composition en différentes fractions azotées, en acides aminés et en acides gras libres. A fin de mieux comprendre le comportement technologique du lait au cours de la fabrication du fromage type camembert d'une part, de connaitre les paramètres qui contribuent à assurer au produit fini ses caractéristiques organoleptiques d'autres part.

Les prélèvements effectués à différents niveaux à savoir le lait, lactosérum et le produit fini ont permis de réaliser un suivi de l'évolution des paramètres physico-chimiques ayant un grand intérêt pour l'industrie fromagère, concernant les paramètres évalués, on a montré qu'il ya une excellente cinétique d'évolution au cours de l'affinage du camembert.

Le suivi de l'activité lipolytique durant l'affinage a montré une nette augmentation de la libération d'acides gras libres volatils du lait jusqu'au fromage (produit fini), on note des valeurs passant respectivement de 0,033mM d'équivalent/100g au premier jour jusqu'au 0,83mM d'équivalent /100g à J20. Ce qui démontre que la lipolyse commence dans le lait cru et s'accentue durant l'affinage.

Les essais réalisés pour l'activité protéolytique par la méthode de dosage au TNBS ont montré, une importante évolution indépendamment de la nature du lait utilisée pour l'élaboration du fromage. Cette protéolyse est intense à partir du neuvième jour d'affinage et continue à se faire de façon progressive jusqu'au dernier stade testé (20 jours). Ce résultat prouve encore une fois, que le niveau de maturation du produit au stade J+9 (qui correspond à la limite pratiquée à l'usine) est insuffisant pour conférer à ce produit dérivé l'ensemble de ses qualités. Cette protéolyse, dans le cas du camembert continuent à se dérouler lors de l'entreposage dans une enceinte réfrigérée mais elle est limité.

En fin, les essais réaliser pour le suivi de l'activité anti-oxydante par l'utilisation de deux méthodes (chélation des ions Fe^{2+} et l'utilisation d'un radical libre DPPH) ont mis en évidence la présence d'une activité anti-oxydante, ceci est dû selon la bibliographie à la libération de petits fragments protéiques, qui donnent au fromage d'autres caractéristiques.

Cette étude mérite d'être consolidé par des études plus poussées avec l'utilisation de méthodes plus précise et plus fiable tel que la chromatographie en phase gazeuse, que par le recours à l'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et l'électrophorèse capillaire (HPCE) et d'autres méthodes plus performante ainsi que d'élargir la durée de l'étude, mais aussi des études comparatives entre le fromage à base de lait cru, lait pasteurise et le lait reconstitué, mais aussi la recherche des activités biologiques dans le lactosérum.

L’effet du camembert sur la santé mérite d’être exploré par la détermination des activités biologiques qui se développent au cours de l’affinage, leurs actions inhibitrices sur les enzymes digestives qui peuvent être responsables d’un certains nombre de cancer colique et avec une meilleur évaluation, la détermination des séquences peptidiques responsable des activités biologiques notamment l’action anti-oxydante et anti microbienne libérée au cours de l’affinage.

Références bibliographiques

ADLER-NISSEN J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid .*Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

AFNOR (1980). Recueil des normes Françaises. Lait et produit laitiers. Méthodes d'analyses.

ALAIS C. (1984). Science du Lait, Principe des Techniques Laitières, Tome 1 et 2. 3eme Ed., Paris. France.

ALAIS C. et LINDEN G. (1993). Biochimie Alimentaire. Masson ,2éme ed., Paris.

ALAIS C., LINDEN G. (1994). Biochimie Alimentaire. Masson, 2eme ed., Paris.

ALAIS C., LINDEN G. et MICLO L. (2008). Biochimie Alimentaire, DUNOD, 6emeEd., Paris.

ANDREWS A.T. (1979). The formation and structure of some proteoses –peptones components. *Journal of Dairy Research*, 46,215-240.

BACHTARZI N. (2012). Qualité microbiologique du lait cru destinée à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algérien. Mémoire de Magister. Institut de la Nutrition et des Technologies Agro-alimentaires. Université Mentouri Constantine., Algérie.

BELKAALOUL GHROUD K. (2015). Propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache et rôle sur la modulation de la fonction intestinale chez la souris BALB/C. Thèse de doctorat. Université D'Oran. Algérie.

BELKAALOUL GHROUD.K., CHEKROUN A., SAIDI D et KHEROUA O. (2014). L'évaluation de l'activité anti-oxydante de fractions peptidiques de lait de vache fermenté par *Lactobacillus paracaseii*. *Nutrition clinique et métabolisme*, 28, S67–S240.

BENBRINIS S. (2012). Evaluation des activités anti-oxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus.* Mémoire de Magistère Université FERHAT Abbas-SETIF., Algérie.

BERTRAND F. (1988). Le fromage grand œuvre des microbes. *Revue générale du froid*, 78, 519-527.

BLANDRAS F. (2008). Etude in vitro de la sensibilité de l'α-casozepine, décapeptide a activité benzodiazépine mimétique, a diverses protéases et peptidases du tractus gastro-intestinale. Étude comportementale chez le rat WISTAR de l'activité anxiolytique de certains produits de dégradation de l'α-casozepine par la pepsine. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique De Lorraine. France.

BOIVIN-PICHE J. (2014). Fabrication de fromages de type Cheddar à partir de laits de fromagerie concentrés en protéines et fortifiés en vitamine D. Mémoire Maîtrise en Sciences et Technologie des Aliments. Université Laval. Québec, Canada.

BOUBEZARI M.T. (2010). Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et Caprines Dans Quelques Elevages De La Région De Jijel. Mémoire de Magistère. Université de Mentouri Constantine., Algérie.

BOURDIER J.M et LUQUET M.F. (1991). Dictionnaire Laitier. Techniques et Documentation, Lavoisier, 2éme ed ., Paris.

BOURDIER J.M., LUQUET M.F. (1991).Dictionnaire Laitier. Techniques et Documentation, LAVOISIER, 2eme ed ., Paris.

BOUTON Y., BOUTON Y., GUYOT P., GUYOT P., DASEN A., GRAPPIN R. (1993). Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comte. I. Validation sur mini fromages des techniques de laboratoire. *Le Lait*, 73 (3), 265-279.

BOUTONNIER J.L. (2008). Matière grasse laitière composition organisation et propriétés. Techniques de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire (F 6320), Paris.

BRADFORD MARION.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, vol 72, 248-254.

CAYOT P et LORIENT D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. Techniques et documentation, Lavoisier, Paris.

CERNING J., GRIPON J.C., LAMBERT G. ET LENOIR J. (1987). Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisé en fromagerie. *Lait*, 67, 3-39.

CHAMPAGNE et *al*, (2002). Science et technologie du lait. Fondation De Technologie Laitière du Québec, Canada.

CHILLIARD Y. et LAMBERET G. (1984). La lipolyse dans le lait. Les différents types, mécanismes, facteurs de variation, signification pratique. *Lait*, 64, 544-578.

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.

CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPON J.L. (1990). Les phénomènes microbiologiques et la biochimie de l'affinage. In « Fromage ». Technique et documentation, Lavoisier, Paris.

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

CODEX STAN 276-1973. Norme Codex Pour Le Camembert.

COGAN T.M. (2011). Bacteria, Beneficial: *Brevibacterium linens, Brevibacterium aurantiacum* and other smear microorganisms. In: Editor-in-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. 395-400

COLIN O. (1990). Taux protéique et qualité fromagère des laits: maitrise des facteurs de production. Thèse de doctorat. Université Lorraine.

COLLINS Y.F., MCSWEENEY P.L.H., Wilkinson M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese. A review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.

COUILLARD CH., ARAYA-FARIAS M., ROZOY É., LAMOTHE S. (2014). Influence de la combinaison de produits laitiers et de breuvages riches en polyphénols sur la biodisponibilité et les réponses physiologiques des composés phénoliques et du calcium après digestion gastro-intestinale. Novalait.

COURTET LEYMARIOS F. (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

CROGUENNEC T., JEANTET R., BRULE G. (2008). Fondements Physico-chimiques et Technologie Laitière. Tech & Doc, Lavoisier, Paris.

DALLES T., KALATZOPOULOS G., VEINOGLOU B., BALTADJIEV M., et STAMENOVA V. (1983). Préparation de fromage a pate molle a partir du lait de brebis avec ou sans moisissure superficielle. *Lait*, 63, 345-353.

DEBRY G. (2001). Lait Nutrition Et Santé. Tech & Doc. Lavoisier. Paris. France.

DEETH H.C. (2011). Milk Lipids Lipolysis and hydrolytic rancidity. In: Editor-in-Chief: John W.F, Editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd Edition). San Diego: Academic Press, 721-726.

DEETH H.C; FITZGERALD C.H and WOOD A.F (1975). A Convenient Method for Determining the Extent of Lipolysis in Milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 30 (9), 109-11.

DENES A. (2006). Etude comparée de l'effet de deux protéases sur La production d'hydrolysats dotés d'activités antioxydante et antiradicalaire. École pratique des hautes études

DESNOUVEAUX R., DRIUO A. et LINDEN C. (1986). Point actuel sur le rôle des enzymes dans la maturation et l'affinage des fromages. *Industrie Alimentaire Agricole*, 112, 911-921.

DIENG M. (2001). Contribution a l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché Dakarois. Thèse Docteur vétérinaire, Université de Dakar Sénégal.

DOREEN G. (2011). Le lait a-t-il des propriétés antioxydantes?. Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Berne.

ECK A et GILLIS J. C. (2006). Le Fromage. Techniques et Documentation, 3emeEd., Lavoisier, Paris.

ECK A. (1975). Le Lait Et L'industrie Laitière. 3emeEd., Presse Universitaire de France.

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

FAO. (1998). Le Lait Produits Laitiers Dans La Nutrition Humaine. Collection Fao : Alimentation Et Nutrition N° 28, ISBN 92-5-20534-6. Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture (FAO) et le Réseau D'information sur Les Opérations Apres Récolte (INPHO).

FLICEK P, BIRNEY E. (2009). Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nat Methods*, 6, S6-S12.

GAREL J.P. et COULON J.B. (1990) Effet de l'alimentation et de la race des vaches sur la fabrication de fromage d'Auvergne de Saint Nectaire. *Production Animal*, 3 (2), 127-136.

GOBBETTI M., LANCIOTTI R., DE ANGELIS M., ROSARIA CORBO M., MASSINI R. AND FOX P. F. (1999). Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(10), 795-809.

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. Tec et Doc Lavoisier, Paris.

GUILLOU, H., PELISSIER, J.P., et GRAPPIN, R. (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache, *Le lait*, 66:143-175.

GUIRAUD J.P. (2003). La microbiologie alimentaire. DUNOD, Paris.

HEINLEIN G.F.W. and CACCESE R. (2006). Goat milk versus cow milk. *Dairy Goat Journal*, 3, 1-5.

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

HUMBERT G. and ALAIS G. (1979). Review of progress of dairy science: the milk proteinase system. *Journal of Dairy Research*, 46, 559-57.

JEAN PIEN. (1974). La détermination de la teneur en matière grasse des laits homogénéisés par la méthode Gerber. *Le Lait*, 54 (533-534), 153-164.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P et BRULE G. (2008). Les produits laitiers.2eme Ed. Tec & doc, Lavoisier. Paris.

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P et BRULE G. (2007).Science des aliments. Tech & doc, Lavoisier. Paris.

KAMINOGAWA S., MISOBUCHI H. and YAMAUCHI K. (1972). Comparison of Bovine Milk Protease with Plasmin. *Agricultural Biology and Cliemistiy*, 36 (2), 163-2167.

KAPAC-PARKACEVA N., BAUER O. et CIZBANOVSKI T. (1974). *MLJEKARSTVO*, 24, 200.

KINSELLA JE., HWANG DH et DWIVEDI B. (1976). Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Revue Food Science*, 8, 191-228.

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.

KUZDZAL-SAVOIE S. (1982). La dégradation lipolytique de la matière grasse laitière. *Techniques laitières*, 966, 17-26.

KUZDZAL-SAVOIE S., AUCLAIR J.E., MORGUES R. ET LANGLOIS. (1974). La lipolyse dans le lait refroidi. *Lait x*, 548-555.

LAMONTAGNE M., CHAMPAGNE CLAUDE.P., REITZ-AUSSEUR.J., MOINEAU S., GARDNER N., LAMOUREUX M., JEAN J.et FLISS I.(2002). Microbiologie du lait in « science et technologie du lait ». Presses Internationales Polytechnique. Canada.

LE ROUX Y. (1994). Qualité protéique des laits a la production: facteurs de variation et recherche d'indicateurs de protéolyse. Thèse de doctorat. L'Institut National Polytechnique de Lorraine.

LECLERCQ-PERLAT M.N., BUONO F., LAMBERT D., LATRILLE E., SPINNLER HE. (2004). Controlled Production of Camembert-Type Cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *J Dairy Res*, 71, 346-354.

LECLERCQ-PERLAT M.N., CORRIEU G., SPINNLER H.E. (2007).Controlled production of camembert-type cheeses. Part III: Role of the ripening microflora on free fatty acid concentrations. *J Dairy Res*, 74, 218-225.

LENOIR J. (1963). La flore microbienne du camembert et son évolution au cours de la maturation. Laboratoire de technologie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon.

LENOIR J., LAMBERT G et SCHMIDT J.L. (1983). L'élaboration d'un fromage, exemple le camembert. *Pour la Science*, 66, 33-42.

LEONIL J. (2013). Peptide bioactifs du lait : bénéfice santé. Science et Technologie du Lait et de l'œuf. INRA, UMR 1253, AGROCAMPUS OUEST 135.

LEONIL J., MAUBOIS J.L. (2002). « Milk-derived bioactive peptides and proteins : future perspectives », *Sciences des Aliments*, vol. 22, 383-392.

LESSARD M.H. (2014). Le suivi de la croissance et de l'activité spécifique des mycètes pendant l'affinage du camembert. Thèse de doctorat. Université Laval. Canada.

LUQUET F. M. (1985). Laits et produits laitiers - vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laiterie. Tech & Doc, Lavoisier, Paris.

LUQUET F.M. (1990). Lait et Produits Laitiers vache, brebis, chèvre. Tome II, Technique et Documentation, 2emeEd, Lavoisier, Paris.

MADJI A. (2009). Séminaire Sur Les Fromages AOP ET IGP.INAT. Tunisie.

MAGGIO-HALL L.A., KELLER N.P. (2004).Mitochondrial beta-oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 54, 1173-1185.

MAHI M. (2010). Etude technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis. Mémoire de magistère, université d'Oran. Algérie.

MARILLEY L. et CASEY M.G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol*, 90, 139-159.

MARTIN B. Et COULON J.B. (1995). Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux. *Lait*, 75, 61-80.

MATHIEU J. (1998). Initiation A la physicochimie du lait. Guides technologiques des IAA. Tech & Doc, Lavoisier, Paris.

MCSWEENEY P.L.H., SOUSA M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening. *Lait*, 80, 293-324.

MEKROUD H. (2010). Effet de la température sur la production laitière dans la région de Sétif. Mémoire de Magistère. Université FERHAT ABBAS- SETIF. Algérie.

MIETTON B. (1990). Technologie des pates molles et dérivées. In « Lait Et Produit Laitiers, Vache, Brebis, Chèvre »Tome II LUQUET M.F. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

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., LE QUERE J.L., SPINNLER H.E. (1997). Les lipides et la flaveur des produits laitiers. *Journal of Dairy Science*, 4, 301-311.

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

NADJERA A.I., BARRON L.J.R., BARCINA Y. (1994). Changes in free acids during the repering of Idiazabal cheese: influence of brining time and smoking. *Journal of Dairy Research*, 61, 281-288.

NOOMEN A. (1977). Noordhollandse Meshanger cheese: a model for research on cheese ripening 2. The ripening of the cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32, 26-48.

NOOMEN A. (1978). Activity of proteolytic enzymes in stimulated soft cheese (Meshanger Type). I. Activity of Milk Protease. *Netherlands milk Dairy Journal*, 32, 26-48.

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO: Alimentation et nutrition, n° 28, ISBN 92-5-20534-6.

PHILIPPE CAYOT-DENIS LORIENT. (1998). Structure et technofonctions des protéines du lait. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 16-23.

POLYCHRONIADOU A. (1988). A simple procedure using trinitrobenzene sulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. *Journal of Dairy Research*. 55, 585-596.

REMEUF F., COSSIN V., DERVIN C., TOMASSON R. (1991). Relation entre les paramètres physico-chimiques des laits et son aptitude fromagère. *Lait*. 71, 397-421.

REMEUF F., LENOIR J. ET DUBY C. (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimique des laits de chèvre et leur aptitude a la coagulation par la présure. *Lait*, 69, 499-518.

RIAHI M.H. (2006). Modélisation des phénomènes microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques intervenant lors de l'affinage d'un fromage de type pate molle croute lave. Thèse de doctorat Institut National Agronomique. Ecole Doctorale ABIES. Paris-Grignon.

SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M.R., RAZOVI S.H., CHOBERT J.M., HAERTLE T., SABOURY A.A., ATRI M.S., NIASARI-NASLAJI A., AHMADE F., MOOSAVI-MOVAHEDIA.A. (2010).enzymatic digestion and antioxidant activity of the native ans molten globule states of camel α-lactalbumin : possible significance for use in infant formula. *International Dairy Journal*. 19, 518-523.

SAOUDI Z. (2012). Caractérisation Microbiologique et de La Protéolyse Du Fromage Traditionnel Algérien « Bouhezza » De Ferme. Mémoire De Magistère. Université Mentouri Constantine. Algérie.

SNOEREN T.H.M and VAN RIEL J.A.M. (1979). Milk proteinase, its isolation and action on αs2 and β casein. *Milchwissenschaft*, 34, 528-53

SPINNLER H.E., GRIPON J.C. (2004). Surface mould-ripened cheeses. In: Fox P.F., MCSWEENEY P.L., COGAN T.M et GUINEE T.P, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Academic Press.157-174.

ST-GELAIS. D., TIRARD-COLLET. P.(2002). In: « Fromage »; VIGNOLA. C. Montréal: Presses internationales Polytechnique. Canada.

SUETSUNA K., UKEDA H et OCHI H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The journal of Nutritional Biochemistry,* 11(3), 128–131.

THEODET C et GANDEMER G. (1990). Comparaison de cinq méthodes pour extraire les lipides du lactosérum et de ses dérivés. *Lait,* 71, 41-54.

TROTTER P.J. (2001). Trotter PJ (2001) The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr,* 21, 97-119.

UPADHYAY V.K., MCSWEENEY P.L.H., MAGBOUL. A., Fox P.F. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. In: Fox PF, MCSWEENEY PL, Cogan TM, Guinee TP, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: *Academic Press*. 391-433.

VASSAL L., MONNET V., LE BARS D., COLETTE ROUX ET GRIPON J.C. (1986). Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type camembert. *Le Lait,* 66 (4), 341-351.

VEISSEYRE R. (1975). Technologie du Lait. 3eme Ed, Maison Rustique, Paris.

VERTES C., HODEN A., GALLARD Y. (**1989)**. Effet du niveau d'alimentation sur la composition chimique et la qualité fromagère du lait de vaches Holstein et Normandes : Résultats préliminaires. *INRA Productions animales,* 2 (2), 89-96.

VIERLING E. (2008). Aliments et boissons filières et produits. 3éme Ed., Biosciences et techniques. Paris. 15-16.

VIGNOLA C.L. (2002). Science et technologie du lait: Transformation du lait. Presses Internationales Polytechnique. Canada.

VISSER F.M.V et DE GROOT-MOSTERT A.E.A. (1977). Contribution Of Enzymes From Rennet, Starter Bacteria And Milk To Proteolysis And Flavour Developement In GOUDA Cheese. 3-Protein breakdown: A gel electrophoresis study. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 31, 247.

WALTHER B. (2006). Peptides Bioactifs Dans Les Laits Et Les Produits Laitiers. Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Berne peptide.

WU, H.C., CHEN H.M., & SCHIAU C.Y. (2003). Free Amino Acids and Peptides as Related to Antioxydant Properties in Protein Hydrolysates of Mackerel (Scomber Austriasicus). *Food Research International,* 36, 949-957.

YANGCHAO LUO, KANG PAN, QIXIN ZHONG. (2014). Physical, Chemical And Biochemical Properties Of Casein Hydrolyzed By Three Proteases: Partial Characterizations. *Food Chemistry,* 155, 146-154.

YVON M., RIJNEN L. (2001). Cheese Flavor Formation By Amino Acids Catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.

Annexes

Annexe 1: Détermination de l'acidité titrable :

❖ **Lait et lactosérum**

Dans un bécher on introduit 10ml du lait prélevé à la pipette.

- Ajouter 0,1 ml (2 à 3 gouttes) de la solution de phénolphtaléine à 1% ;
- Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium (0,11 N) jusqu'au virage au rose, facilement perceptible par comparaison à un témoin constitué du même lait.

1ml de NaOH versé correspond à 1 g/l d'acide lactique, le résultat est exprimé en (°D) ou 1°D=0,1 g d'acide lactique par litre du lait.

❖ **Fromage selon la méthode cité par SAOUDI (2012)**

Pour le dosage de l'acidité du fromage, une masse de 10g de fromage est placée dans un récipient d'homogénéisation.

- On ajoute un volume de 40 ml d'eau distillée à 60°c et mélangé à faible vitesse.
- Le récipient d'homogénéisation est rincé deux fois par 30ml d'eau distillée et ajouté au mélange.
- Le mélange est centrifugé à 4700g/20min
- Après centrifugation le surnageant est placé dans une fiole jaugée et le volume est complété à 100ml par l'eau distille
- Un volume de 50ml est prélevé pour être titré par une solution de NaOH (0,1N) jusqu'au virage au rose, en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.
- Expression des résultats :

$$Acidité\ titrable\ (\%\ en\ acide\ lactique) = \frac{\mathrm{VNaOH} \times \mathrm{N} \times 90{,}05}{50}$$

V_{NaOH} : volume en millilitre de solution de NaOH.

N (mol/l) : normalité de solution de NaOH.

90,05(g/mol) : la masse molaire de l'acide lactique.

Annexe2: Détermination de la densité du lait et du lactosérum

- Prélever 500ml de lait, les mètre dans une éprouvette de manière à ce que le lait déborde légèrement pour entrainer la trace de mousse ;

- Plonger le lactodensimètre jusqu'à ce qu'il se stabilise ;
- La densité du lait s'obtient par la lecture directe sur le lactodensimètre.

Le lactodensimètre donne une valeur exacte à une température de 15°c.si la température est supérieur à 15°c, on ajoute 0,0002 par degré Celsius. Dans le cas contraire, on soustrait 0,0002 par degré.

Annexe 3 : Détermination de l'extrait sec total (EST)

❖ Lait et lactosérum

- Dans une capsule séchée et tarée, à l'aide d'une pipette, peser 3g de lait ou de lactosérum, homogénéiser et bien repartir.
- Introduire la capsule dans le dessiccateur réglé à 105°c ;
- Laisser chauffer pendant 20 minutes

L'extrait sec est lu directement sur l'afficheur du dessiccateur. L'extrait sec est donné en %.

❖ Fromage

- Pour le fromage c'est le même principe que le lait sauf qu'on va peser 5g au lieu de 3g.

Annexe 4 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de BRADFORD (1976).

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

1. A partir de la solution mère de BSA 2mg/mol on prépare des séries de solutions filles [0,1 à mg/ml] ;

2. Dans des tubes à essai on prélève 0,05ml de l'échantillon et on ajoute 1,5ml du réactif de BRADFORD, vortexé puis mettre à l'obscurité pendant 5minutes ;

3. Lire la DO à 595 nm.

Annexe 5 : Détermination de la teneur en matière grasses par la méthode de GERBER (1974)

❖ **Pour le lait et le lactosérum**

- Introduire 10 ml d'acide sulfurique (d=1,83) dans le butyromètre de GERBER (sans mouiller le cou du butyromètre) ;
- A l'aide d'une pipette jaugée prélever 11 ml du lait ou de lactosérum à analyser, puis le verser dans le butyromètre ;

- On ajoute 1ml d'alcool isoamilyque ;
- Bien fermer les butyromètres, agiter et retourner afin de bien dissoudre les protéines ;
- Placer les butyromètres dans la centrifugeuse pendant 5 minutes
- Maintenir verticalement le butyromètre, ajuster le bouchon pour amener la colonne de matière grasse dans la zone de l'échelle. Lire le résultat.

La teneur en matière grasse est exprimée en g/l du lait.

Pour le fromage

- Placer le godet sur une balance puis tarer la balance ;
- Peser 3g de fromage (prise d'essai) ;
- Placer le godet dans le butyromètre spécifique pour le fromage ;
- Verser à l'aide d'une pipette 15ml d'acide sulfurique (densité = 1,52) jusqu'à l'immersion totale de la prise d'essai ;
- Fermer l'ouverture de remplissage ;
- Mettre le butyromètre échelle vers le haut au bain marie à 70-80°c et retourner à plusieurs reprises jusqu'à la dissolution complète du fromage ;
- Retirer du bain marie et ajouter 1ml d'alcool isoamilyque par l'ouverture de l'échelle puis compléter par l'acide jusqu'à la marque de 15% de l'échelle ;
- Retourner 2 fois puis mettre dans la centrifugeuse ;
- Tenir verticalement le butyromètre, ajuster le bouchon du col afin d'amener la colonne de matière grasse dans la zone de l'échelle ;
- Lire directement le taux, exprimé en grammes de matière grasse pour 100g de fromage.

Annexe 6 : Dosage des amines primaires libres par la méthode au TNBS

Solutions utilisées

Tampon borate (0,1 M) ;
NaOH (0,1 M) ;
(pH=9,5)

Solution d'arrêt (phosphate/sulfate)

NaH_2PO_4 (0,1 M) ;
Na_2SO_3 (1,5 M).

Solution du réactif TNBS

Dilution ($1/50^{e}$) de la solution mère concentre à 5%.

Mode opératoire

1gramme du fromage est dispersé dans 20 ml du tampon borate (pH 9,5) ;

- Chauffage à 45°c pendant 15 mn sous agitation ;
- Centrifugation à 3000×g pendant 20 mn ;
- A 0,5ml de la dilution 1/25^{e} du surnagent obtenu, on ajoute 1 ml du tampon borate et 0,5 ml de la solution du réactif TNBS à 0,1%, puis agiter ;
- Incuber à 37°c pendant 60 mn ;
- Ajouter 2 ml de la solution phosphate/sulfite afin d'arrêter la réaction ;
- Lire la D.O a 420 nm.

La concentration en amines X recherchées est déterminée en portant la valeur de la D.O correspondante sur l'axe des ordonnées, qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses de la courbe d'étalonnage.

Annexe 7 : Dosage des acides gras libres par la méthode titrimétrique de DEETH *et al* (1975).

Préparation des solutions fromagères destinées à l'analyse de l'acidité de la matière grasse

*Ajouter 15ml d'eau distillée à 20 g de fromage ;

*La suspension est bien mélangée dans un mixeur pendant 04 min.

Extraction

L'extraction est faite à partir de 4 ml de lait ou de la solution fromagère, avec 10ml du mélange d'extraction α-isopropanol-Hexane-H_2SO_4 (4N) (40/10/1/V, V, V) ;

L'ensemble est agité énergétiquement pendant 5min puis on ajoute dans le même tube 6ml d'hexane et 4ml d'eau distillée ; On laisse décanter quelques minutes.

***Titration**

- On transfert 5ml du surnageant dans un tube à essai.
- On y ajoute 6 gouttes de phénolphtaléine méthanoleique à 1%.
- On titre l'acidité avec du NaOH à 1N ;
- La coloration rosâtre indique la fin de la titration.

***Expression des résultats**

L'acidité est exprimée en équivalent acide oléique dans 100g de matière grasse en se référent à la courbe d'étalonnage (v NaOH versé en fonction de la concentration en acide oléique).

Annexe 8 : Recherche de l'activité anti-oxydante

1. **Préparation des solutions fromagères**

- Pour 20g de fromage on ajoute 20ml d'eau distillée ;
- Homogénéiser pendant 1min, chauffer à 40°c pendant 1heure ;
- La solution fromager obtenue est centrifugée à 3000×g pendant 30min à 4°c ;
- La crème est éliminée, la fraction fromagère insoluble est ressolubilisée ;
- La fraction soluble de la solution fromager est récupérée, on lui ajoute 25ml du TCA à 12% ;
- Centrifuger et récupérer le surnagent.

2. **Protocol du pouvoir chélateur**

- Des dilutions de 30µl/ml sont préparées ;
- On prélève 1ml de la solution et on lui ajoute 1ml du tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) ;
- Ajouter 1ml de $K_3Fe(CN)_6$ à 1%, ce mélange est vortexé puis incubé à 50°c pendant 20min ;
- Refroidir à température ambiante, ajouter 2ml du TCA à 10% ;
- Centrifuger à 5000×g pendant 20 minutes, le surnageant récupéré et additionné à 0,3µl de $FeCl_3$.
- Incubé pendant 10 min à température ambiante, l'absorption est faite à700 nm.

3. **Protocol du pouvoir anti-radicalaire**

- Des solutions à 0,6mg/ml de chaque fraction sont préparées **;**
- 500µl de la solution sont ajoutées à 500µl d'éthanol à 99% et 125µl d'éthanol contenant 0,01% de DPPH ;

- Homogénéisation, la solution est laissée à l'obscurité pendant 24h à température ambiante ;
- L'absorption est faite à 517 nm.

Le pouvoir réducteur est calculé comme suit :

% d'inhibition= (A contrôle-A solution)/control×100

A contrôle : Absorption de la solution DPPH sans l'échantillon

A solution (échantillon) : Absorption de l'échantillon (test+DPPH) le blanc est à base d'eau distillée ou éthanol à la place de l'échantillon.

Annexe 09 : résultats des analyses statistiques

Tableau 01 : Résultats des analyses de l'EST des 3 échantillons de formages durant l'affinage

Production / **jours**	**Echantillon 1**	**Echantillon 2**	**Echantillon3**	**Moyenne**
J1	42,5	42,8	43	42,76±0,25
J9	44	42,96	43,63	43,53±0,52
J15	46,67	46,5	46	46,39±0,34
J20	50,03	50	49,9	49,97±0,068

Tableau 02 : Résultats de l'analyse de la variance de l'EST des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	97,158	11	8,833				
Variation de la Durée	96,224	3	32,075	274,631	0		
Variation RESIDUELLE 1	0,934	8	0,117			0,342	0,75%

Tableau 03: Résultats des analyses de la matière grasse des fromages dans les différents stades d'affinages.

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	23	22	24	23±1
J9	22	21	23	22±1
J15	24	23	24	23,66±0,57
J20	26	25	26	25,66±0,57

Tableau 04: Résultats de l'analyse de la variance pour la matière grasse des fromages.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	26,917	11	2,447				
Variation de la Durée	21,583	3	7,194	10,792	0,0038		
VAR.RESIDUELLE 1	5,333	8	0,667			0,816	3,46%

Tableau 05: Résultats des mesures du pH des différents fromages.

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	5,1	5	5,2	5,1±0,1
J9	5,5	5,4	5,5	5,46±0,057
J15	5,7	5,6	5,5	5,6±0,1
J20	5,8	5,7	5,9	5,8±0,1

Tableau 06: Résultats de l'analyse de la variance pour le pH des différents fromages.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,849	11	0,077				
Variation de la Durée	0,783	3	0,261	31,3	0,00015		
Variation RESIDUELLE 1	0,067	8	0,008			0,091	1,66%

Tableau 07: Résultats de l'analyse de l'acidité des fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	9,18	9,9	10,62	9,9±0,72
J9	9,9	6,48	9,54	8,64±1,87
J15	6,84	7,2	6,48	6,84±0,36
J20	6	6,84	6,06	6,30±0,46

Tableau 08: Résultats de l'analyse de la variance pour la mesure de l'acidité des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	33,487	11	3,044				
Variation de la Durée	24,689	3	8,23	7,483	0,01079		
Variation RESIDUELLE 1	8,798	8	1,1			1,049	13,24%

Tableau 08: Résultats des mesures des protéines totales pour les fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	12,58	12,05	11,52	12,05±0,53
J9	13,9	14,6	15,3	14,6±0,7
J15	16	16,8	15,2	16±0,8
J20	17,5	16,8	18,2	17,5±0,7

Tableau 09: Résultats de l'analyse de la variance pour la mesure des protéines totales des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	52,122	11	4,738				
Variation de la Durée	48,321	3	16,107	33,893	0,00012		
Variation RESIDUELLE 1	3,802	8	0,475			0,689	4,58%

Tableau 10: Résultats des mesures du taux de protéines seriques dans les fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,61	0,59	0,57	0,59±0,02
J9	0,67	0,68	0,66	0,67±0,01
J15	1,09	1,1	1,08	1,09±0,01
J20	2,33	2,55	3,77	2,88±0,77

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de la variance pour les protéines seriques des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	11,56	11	1,051				
Variation de la Durée	10,355	3	3,452	22,923	0,00039		
Variation RESIDUELLE 1	1,205	8	0,151			0,388	29,66%

Tableau 12: Résultats des mesures du taux d'azote non protéique dans les fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,03	0,028	0,026	0,028±0,002
J9	0,01	0,03	0,04	0,026±0,015
J15	0,02	0,05	0,03	0,033±0,015
J20	0,04	0,011	0,069	0,04±0,029

Tableau 13: Résultats de l'analyse de la variance pour les mesures des taux d'azote non protéiques des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,003	11	0				
Variation de la Durée	0	3	0	0,336	0,80129		
Variation RESIDUELLE 1	0,003	8	0			0,018	56,59%

Tableau 14: Résultats des mesures des taux d'acides aminés libres des fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,63	0,62	0,61	0,62±0,01
J9	0,64	0,64	0,65	0,64±0,005
J15	0,67	0,68	0,69	0,68±0,01
J20	0,69	0,71	0,7	0,7±0,01

Tableau 15: Résultats de l'analyse de la variance pour la mesure des taux d'acides aminés libres

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,012	11	0,001				
Variation de la Durée	0,012	3	0,004	46,453	0,00005		
Variation RESIDUELLE 1	0,001	8	0			0,009	1,38%

Tableau 16: Résultats des mesures des taux d'acides gras libres dans les fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,13	0,14	0,12	0,13±0,01
J9	0,49	0,53	0,45	0,49±0,04
J15	0,4	0,6	0,8	0,6±0,2
J20	0,76	0,83	0,9	0,83±0,07

Tableau 17: Résultats de l'analyse de la variance pour la mesure des taux d'acides gras libres des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,859	11	0,078				
Variation de la Durée	0,766	3	0,255	21,912	0,00044		
Variation RESIDUELLE 1	0,093	8	0,012			0,108	21,06%

Tableau 18: Résultats des mesures du pouvoir chélateur pour les protéines seriques des fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	60,5	61,26	61	60,92±0,38
J9	65,5	65	64,9	65,13±0,32
J15	70,39	69,99	70,2	70,19±0,2
J20	93,6	92,99	93,1	93,23±0,32

Tableau 19: Résultats de l'analyse de la variance des mesures du pouvoir chélateur pour les protéines seriques des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	1870,845	11	170,077				
Variation de la Durée	1870,048	3	623,349	6260,816	0		
Variation RESIDUELLE 1	0,797	8	0,1			0,316	0,44%

Tableau 20: Résultats des mesures du pouvoir chélateur de l'azote non protéique des fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	54,28	54	54,19	54,15±0,14
J9	60,3	59,9	60	60,06±0,20
J15	68	68,6	68,86	68,48±0,44
J20	82	81,99	82,29	82,09±0,17

Tableau 21: Résultats de l'analyse de la variance des mesures du pouvoir chélateur des protéines seriques des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	1322,034	11	120,185				
Variation de la Durée	1321,459	3	440,487	6131,632	0		
Variation RESIDUELLE 1	0,575	8	0,072			0,268	0,40%

Tableau 22: Résultats de la mesure du pouvoir chélateur des caséines de fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	28,53	28,69	29	28,74±0,23
J9	47	46,6	46,9	46,83±0,2
J15	73,8	72,9	73	73,23±0,49
J20	76,93	76	77	76,64±0,55

Tableau 23: Résultats de l'analyse de la variance des mesures du pouvoir chélateur des caséines de fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	4650,544	11	422,777				
Variation de la Durée	4649,233	3	1549,745	9456,616	0		
Variation RESIDUELLE 1	1,311	8	0,164			0,405	0,72%

Tableau 24: Résultats de l'activité anti-radicalaire des protéines sériques

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,029	0,03	0,031	0,03±0,001
J9	0,032	0,034	0,035	0,033±0,0015
J15	0,034	0,037	0,036	0,035±0,0015
J20	0,056	0,054	0,058	0,056±0,002

Tableau 25: Résultats de l'analyse de la variance pour la mesure de l'activité anti-radicalaire des protéines sériques

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,001	11	0				
Variation de la Durée	0,001	3	0	169,425	0		
Variation RESIDUELLE 1	0	8	0			0,002	4,00%

Tableau 26: Résultats des mesures de l'activité anti-radicalaire pour la fraction azote non protéique des différents fromages

Productions / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,016	0,018	0,02	0,018±0,002
J9	0,079	0,08	0,081	0,08±0,001
J15	0,084	0,085	0,088	0,085±0,002
J20	0,098	0,1	0,097	0,098±0,001

Tableau 27: Résultats de l'analyse de la variance pour l'activité anti-radicalaire de la fraction azote non protéique

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,012	11	0,001				
Variation de la Durée	0,012	3	0,004	1320,418	0		
Variation RESIDUELLE 1	0	8	0			0,002	2,42%

Tableau 28: Résultats de l'activité anti-radicalaire des caséines des fromages

Production / jours	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon3	Moyenne
J1	0,054	0,055	0,052	0,053±0,001
J9	0,056	0,057	0,055	0,056±0,001
J15	0,06	0,064	0,063	0,062±0,002
J20	0,223	0,224	0,222	0,223±0,001

Tableau 29: Résultats de l'analyse de la variance pour la mesure de l'activité anti radicalaire des caséines des fromages

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	p-value	E.T.	C.V.
Variation TOTALE	0,062	11	0,006				
Variation de la Durée	0,062	3	0,021	9518,668	0		
Variation RESIDUELLE 1	0	8	0			0,001	1,49%