

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



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Biologiques
Option : Microbiologie

Thème

**Caractéristiques du lait et évaluation de la phase d'affinage
des fromages à pâte molle type Camembert fabriqués dans la
région de Tizi-Ouzou à partir du lait cru ou du lait pasteurisé**

Présentée par : M^r SEBBANE Hillal

Devant le jury :

Président :	M^r. HOUALI Karim	Professeur	Univ. Tizi-Ouzou
Directeur de thèse :	M^r. MATI Abderrahmane	Professeur	Univ. Tizi-Ouzou
Examineurs :	M^{me}. HALOUANE-SAHIR Fatma	Professeur	Univ. Boumerdes
	M^r. MEBARKIA Abdelkrim	Professeur	Univ. Sétif
	M^r. AIT OUAZOU Abdenour	MCA	Fac. Central Alger
	M^r. DJENANE Djamel	Professeur	Univ. Tizi-Ouzou

2020-2021

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur
elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.

Marcel Proust

Au terme de cette thèse, je tiens vivement à remercier toutes les personnes, qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont accompagné tout au long de ce parcours. Ce travail de recherche n'aurait pu arriver à sa fin sans le soutien, la confiance et la patience dont elles ont fait preuve à mon égard.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de thèse **M^r MATI Abderrahmane**, professeur en Biochimie Appliquée à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance, m'ont beaucoup appris.

Je remercie chaleureusement **M^r HOUALI Karim**, professeur en Microbiologie à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, de l'honneur qu'il me fait de siéger à ce jury de cette thèse, et en acceptant de présider cette thèse et de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier également les membres du jury d'avoir accepté de juger et d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer :

- **M^{me} HAKOUANE-SAHIR Fatma**, Professeur, à l'Université de Boumerdes.
- **M^r DJENANE Djamel**, Professeur, à l'Université de Tizi-Ouzou.
- **M^r AIT OUAZOU Abdenour**, maître de conférences de classe A, à la Fac centrale d'Alger.
- **M^r MEBARKIA Abdelkrim**, Professeur à l'université de Sétif.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à **AIT ABDELMALEK Arezki et Fahima**, propriétaire de la fromagerie artisanale Saint-amour, de m'avoir accueillie au sein de leur famille. Leurs conseils et leurs orientations, m'ont été précieux pour réussir la fabrication du Camembert artisanal.

Je remercie également **M^{me} KERROUR**, responsable au sein du laboratoire de la fromagerie industrielle, pour son aide, sa compréhension et de m'avoir facilité la collecte des échantillons, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Ma gratitude s'adresse tout particulièrement à **M^r SLIMANI Said**, maître de conférences à l'UMMTO, pour sa gentillesse, sa disponibilité et de m'avoir aidé dans la rédaction de l'article en anglais. Il peut être assuré de mon sincère respect et de ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier **Mme SMAIL-SAADOUN Nouria**, Professeur à l'UMMTO et **M^r BEKDOUCHE Farid**, maître de conférence à l'université de Batna 2, pour leurs conseils, leurs disponibilités et pour leurs aides précieuses dans le traitement statistique des données.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont également fait bénéficier de leurs conseils et de leurs expériences au sein du Laboratoire de Biochimie Appliquée et Biotechnologies : enseignants, doctorants et ingénieurs de laboratoire, pour lesquels je ne trouve pas les mots juste pour décrire ce que j'éprouve envers eux après durant ces années passées ensemble. J'ai beaucoup apprécié leurs qualités humaines et les échanges scientifiques que nous avons eus et leurs encouragements.

Mes remerciements vont aussi à ma très chère famille qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final, sans oublier ma belle famille.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Mes parents pour leur soutien moral et matériel pendant les périodes les plus difficiles de ma vie et leur confiance indéfectible avec mes choix. Mes petits anges **Aghiles** et **Massinissa** qu'ils puissent trouver ici une raison valable au fait de les avoir délaissés en cette période cruciale dans leur vie. Je remercie particulièrement ma femme et collègue « **Dalila** » pour la grande patience, l'encouragement, la confiance et surtout pour son soutien moral ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour la mémoire de notre regretté et défunt, notre cher collègue **M^r HADJ-KACI Amar**, qui m'a appris à faire le bon usage de l'éthique et déontologie universitaire au profit de la communauté universitaire dont la mémoire partagée n'est pas étrangère à mon goût pour l'histoire, la mission du département BMC et de l'enseignement universitaire.

Grand MERCI à tous

Résumé

Le fromage à pâte molle type Camembert est parmi les produits laitiers le plus prisé par le consommateur algérien. Néanmoins, sa qualité dépend de celle la qualité de matières premières utilisés et des conditions de productions. Cette étude a été réalisée sur deux types de Camembert produits dans la région de Tizi-Ouzou (nord de l'Algérie), l'un artisanal (CA) au lait cru et l'autre industriel (CI) au lait pasteurisé. L'investigation in situ sur les productions du Camembert, a pour objectif d'évaluer la qualité du lait et les procédés de fabrication du Camembert sur l'évolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant une période d'affinage de 12 jours. Pour cela, 108 échantillons de chaque Camembert (CA ou CI) et 27 échantillons de chaque lait (lait cru ou pasteurisé) sont prélevés annuellement (2014-2016) sur les mêmes périodes allant de mois de mars au mois de juin.

Les résultats des analyses effectuées ont montré que les paramètres physico-chimiques et microbiologiques, pendant la maturation des fromages se sont développés de manière similaire avec des différences significatives selon le type et le stade de maturation. Au cours de la période d'affinage des fromages, le CA a montré une lipolyse et une protéolyse plus importantes ($P < 0,05$) que CI. Les électrophorèses réalisées en SDS-PAGE des fractions protéiques hydrosolubles (FPH) et des fractions insolubles ont montré une dégradation plus étendue de la α -caséine (α -CN) que la β -caséine (β -CN). Le profil des fractions solubles, analysé par chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC), ont donné un nombre de pics plus élevé dans le cas du CA, avec un maximum atteint au 12^{ème} jour d'affinage. Le résultat microbiologique ont montré que la microflore d'affinage et les populations microbiennes indésirables sont significativement plus élevées ($P < 0,05$) dans le cas du Camembert au lait cru. Néanmoins, la flore de contamination diminue au cours du processus de maturation. Ce constat a été confirmé par les résultats des activités antibactériennes de fractions hydrosolubles des fromages sur les souches d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, suggérant par-là que les produits des activités hydrolytiques (notamment la protéolyse) possèdent un effet antibactérien certain qui concoure à assurer la salubrité du produit. L'activité anti-oxydante des fractions solubles et insolubles des fromages, mesurée par le test de DPPH et FRAP, a augmenté au cours de l'affinage avec un effet significativement élevé dans les fractions hydrosolubles de CA.

A partir des résultats de cette étude, il est permis d'entrevoir et d'encourager la fabrication du fromage type Camembert de bonne qualité à partir du lait cru collecté localement, pour peu que les conditions de salubrité soient rigoureusement respectées, tant au niveau de la production de ce lait que de sa transformation en fromage.

Mots clés : Lait cru / Lait pasteurisé / Affinage / Camembert / Activités anti-oxydante / Activité antimicrobienne / Qualité

Abstract

The soft cheese type Camembert is among the dairy products most prized by the Algerian consumer. Nevertheless, its quality depends on the quality of raw materials used and production conditions. This study was conducted on two types of Camembert produced in the region of Tizi-Ouzou (northern Algeria), one artisanal (CA) with raw milk and the other industrial (CI) with pasteurized milk. The objective of the in situ investigation on the Camembert productions is to evaluate the quality of the milk and the Camembert manufacturing processes on the evolution of the physico-chemical and microbiological parameters during a 12 days ripening period. For this purpose, 108 samples of each Camembert (CA or CI) and 27 samples of each milk (raw or pasteurized milk) are taken annually (2014-2016) over the same periods from March to June.

The results of the analyses carried out showed that the physico-chemical and microbiological parameters, during the ripening of the cheeses developed in a similar way with significant differences according to the type and stage of ripening. During the ripening period of the cheeses, CA showed greater lipolysis and proteolysis ($P < 0.05$) than CI. Electrophoresis performed in SDS-PAGE of the water-soluble protein fractions (FPH) and insoluble fractions showed more extensive degradation of α -casein (α -CN) than β -casein (β -CN). The FPH profile, analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), was higher in the case of CA with a maximum reached on the 12th day of ripening. The microbiological result shows that the ripening microflora and undesirable microbial populations are significantly higher ($P < 0.05$) in the case of raw milk Camembert. Nevertheless, the contamination flora decreased during the ripening process. This finding was confirmed by the results of antibacterial activities of water-soluble cheese fractions on *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC25923 strains. The antioxidant activity of the soluble and insoluble fractions of the cheeses, measured by the DPPH and FRAP assays, increases during ripening with a significantly high effect in the water-soluble fractions of CA.

From the results of this study we can conclude that it is possible to foresee and encourage the manufacture of Camembert type cheese of good quality from raw milk collected locally, provided that the conditions of healthiness are rigorously respected, both at the level of production of this milk and its processing into cheese.

Key words: Antioxidant and antimicrobial activities. Algeria, Camembert, Raw and pasteurized milk, Ripening.

Sommaire

Liste des tableaux	(i)
Liste des figures	(ii)
Liste des abréviations	(iii)
Introduction.....	1
I : Synthèse des données bibliographiques	
1.1. Etat de la filière lait en Algérie.....	3
1.1.1 Evolution de la production locale et des importations des produits laitiers.....	3
1.1.1.1. Etat du cheptel laitier	3
1.1.3. Etat filière lait au niveau de la wilaya Tizi-Ouzou.....	4
1.1.4. Principales contraintes de la production laitière.....	5
1.2. Protéines du lait.....	5
1.2.1. Protéines sériques.....	5
1.2.2. Caséines.....	5
1.2.2.1. Composition et caractéristiques générales	5
1.2.2.2. Organisation de la micelle.....	6
1.3. Technologie fromagère.....	9
1.3.1. Définition du fromage.....	9
1.3.2. Classification des fromages.....	9
1.3.3. Notion de terroir et appellation d'origine.....	9
1.3.4. Etapes principales de la fabrication des fromages.....	10
1.3.4.1. Coagulation.....	10
1.3.4.2. Egouttage et moulage.....	13
1.3.4.3. Salage et ressuyage.....	14
1.3.4.4. Affinage.....	16
1.4. Camembert.....	20
1.4.1. Fabrication et affinage du Camembert.....	21
1.4.1.1. Prétraitement du lait.....	21
1.4.1.2. Production fermière.....	21
1.4.1.3. Production industrielle	23
1.4.1.3.1. Standardisation microbiologique.....	23
1.4.1.3.2. Standardisation biochimique.....	23
1.4.1.4. Maturation du Camembert.....	23
1.4.1.5. Emprésurage, moulage et démoulage.....	23
1.4.1.6. Evolution physicochimiques et microbiologiques lors de l'affinage.....	24
1.5. Peptides bioactifs libérés lors de l'affinage des fromages.....	25
1.5.1. Peptides à activité anti-oxydante.....	26
1.5.2. Peptides à activité anti-microbienne.....	26
1.5.3. Peptides à activité anti-hypertensive.....	29
1.5.4. Autres peptides bioactifs	29
II : Matériel et Méthodes	
2.1. Matériel.....	30
2.1.1. Appareillage.....	30
2.1.2. Kits de diagnostics et matériel biologique.....	30
2.1.3. Produits et réactifs spécifiques.....	31
2.2. Méthodes.....	31
2.2.1 Echantillonnage.....	31
2.2.2. Fabrication du fromage.....	32
2.2.2.1. Camembert artisanal.....	32

2.2.2.2. Camembert Industriel.....	33
2.2.3. Analyses physico-chimiques du lait.....	33
2.2.4. Analyses physico-chimiques du fromage.....	35
2.2.5. Suivi de la protéolyse.....	38
2.2.5.1. Dosage des groupements α -aminé par l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS).....	38
2.2.5.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes sur gel de polyacrylamide...	39
2.2.5.3. Suivi de la protéolyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Inversée (RP-HPLC).....	40
2.2.6. Suivi de la lipolyse.....	40
2.2.7. Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	41
2.2.7.1. Test du DPPH.....	41
2.2.7.2. Pouvoir réducteur ou test FRAP.....	43
2.2.8. Microflore du lait et du Camembert.....	43
2.2.8.1. Dénombrement de la microflore du lait et des flores au cours de l'affinage.....	43
2.2.8.2. Technique du California mastitis test (CMT).....	44
2.2.8.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	45
2.2.8.3.1. Préparation des fractions hydrosolubles de fromage.....	45
2.2.8.3.2. Détermination de l'activité antibactérienne.....	47
2.2.9 Analyses statistiques.....	48

III : Résultats et discussion

3.1. Evaluation de la phase d'affinage des fromages fabriqués.....	49
3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des laits et des fromages.....	49
3.1.1.1. Analyses des laits.....	49
3.1.1.2. Analyses des fromages.....	50
3.1.2. Evolution de la protéolyse et de la lipolyse au cours de l'affinage.....	52
3.1.2.1. Évaluation des indices de la protéolyse par dosage des fractions.....	52
3.1.2.2. Suivi de l'évolution de la fraction soluble par RP-HPLC.....	53
3.1.2.3. Suivi par électrophorèse de la fraction soluble et insoluble.....	54
3.1.2.4. Evolution de la lipolyse au cours de l'affinage.....	55
3.1.3. Evolution de la microflore au cours de l'affinage.....	56
3.1.3.1. Microflore présente dans le lait analysé.....	56
3.1.3.2. Microflore présente dans les fromages.....	57
3.1.4 Etude de l'affinage des fromages par l'analyse en composantes principales.....	59
3.1.4.1. Paramètres physico-chimiques.....	59
3.1.4.2. Etude de l'évolution de la microflore d'affinage par ACP	61
3.1.4.3. Etude de l'interaction entre les paramètres physicochimiques et la flore microbienne par ACP.....	62
3.2. Evaluation de quelques activités biologiques des fractions fromagères	64
3.2.1. Activité antibactérienne des fractions hydrosolubles.....	64
3.2.1.1. Vérification de l'identité des souches tests.....	64
3.2.1.2. Activité antibactérienne.....	64
3.2.2 Activités anti-oxydantes.....	68
3.2.2.1. Activité antiradicalaires et pouvoir réducteur des fractions fromagères.....	68
3.2.2.2. Corrélation entre les produits d'hydrolyse et les activités anti-oxydantes	69
Conclusion et perspectives.....	71
Références bibliographiques.....	76

Annexes

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
I	Evolution de production des produits laitiers en Algérie	4
II	Composition moyenne de la micelle de caséines (g/100g)	6
III	Caractéristiques principales de la micelle de caséine à l'état natif, à température ambiante.	7
IV	Principales caractéristiques des caséines du lait de vache	7
V	Classification des fromages en fonction de la consistance, de la teneur en matière grasse et des principales caractéristiques d'affinage	9
VI	Peptides bioactifs provenant de différents types de fromage et de leurs effets fonctionnels <i>in vitro</i>	27
VII	Répartition des échantillons selon le type du lait et le stade d'affinage	32
VIII	Flore microbienne recherchée du lait et du fromage au cours de l'affinage	44
IX	Analyses des paramètres physico-chimiques des laits utilisés dans les fabrications fromagères	49
X	Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'affinage des fromages(artisanal / industriel)	50
XI	Evolution des protéines solubles, azote non protéique, acides aminés libres et acides gras libres au cours de l'affinage des fromages (artisanal/industriel) fabriqués	52
XII	Evolution de lipolyse au cours de l'affinage des fromages fabriqués	55
XIII	Dénombrement de la microflore ($\log_{10}$ UFC/mL) des laits utilisés dans les essais de fabrications des fromages type Camembert (artisanal /industriel) fabriqués	56
XIV	Evolution de la microflore au cours de l'affinage des fromages Type Camembert (artisanal /industriel) fabriqués	57
XV	Tableau de corrélation de Pearson des interactions microbiennes lors de l'affinage des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI)	62
XVI	Résultats des corrélations de Pearson des interactions physico-chimique et microbiologique lors de l'affinage des fromages type Camembert (artisanal / industriel) fabriqués	63
XVII	Résultats des tests physiologiques des souches utilisées	64
XVIII	Résultats des tests biochimiques des galeries API 20 E (<i>E. coli</i> ATCC 25922)	64
XIX	Activité antibactérienne des surnageants de fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI)	65
XX	Activité antiradicalaire (% inhibition du DPPH) et pouvoir réducteur (FRAP) au cours de l'affinage des fromages (artisanal / industriel) fabriqués	69
XXI	Corrélations entre les produits de la protéolyse (PS, ANP, AAl) et les activités antioxydantes (DPPH, FRAP) des fractions solubles et insolubles des fromages (CA et CI)	70

Liste des figures

N°	Titres	Pages
01	Evolution du cheptel en Algérie durant les années du 2000à 2009	4
02	Modèle sub-micellulaire des micelles de caséine montrant les structures protéiniques et la disposition de la surface de la caséine κ (A) et pontage de deux sub-micelles par le phosphate de calcium (B)	8
03	Phases de la coagulation enzymatique du lait et formation du réseau	11
04	Représentation schématique du processus de coagulation du lait par acidification	13
05	Exemple de classification des fromages selon Almena-Aliste et Mietton	15
06	Représentation schématique de la succession des principaux groupes microbiens au cours de la fabrication des fromages	17
07	Représentation schématique des interactions entre les bactéries lactiques du type SLAB et NSLAB pendant la phase d’affinage du fromage	17
08	Mécanismes biochimiques de l’affinage des fromages	18
09	Etapas de fabrication du Camembert fermier et industriel	22
10	Changements physico-chimiques pendant l’affinage du Camembert	24
11	Représentation schématique des voies employées pour la production de peptides bioactifs	25
12	Sites d’échantillonnage et de production des fromages	31
13	Delvotest ® -SP-NT 25 ampoules	34
14	Incubateur Delvotest SP-NT	35
15	Interprétation des résultats Delvotest SP-NT	35
16	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry	36
17	Protocole de fractionnement des protéines à partir des fromages type Camembert fabriqués (artisanal / industriel).	37
18	Réaction de l’acide 2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) avec un acide aminé	38
19	Courbe étalon pour le dosage des groupements NH_2 libres	38
20	Unité de chromatographie liquide de haute performance (RP-HPLC)	40
21	Courbe étalon pour le dosage des acides gras libres par la méthode de DEETH	41
22	Spectre d’absorption UV du DPPH avant et après réaction avec un antioxydant	42
23	Courbe d’étalonnage du pourcentage d’inhibition du DPPH en fonction de concentration de l’acide ascorbique	42
24	Courbe d’étalonnage du pouvoir réducteur (FRAP)	43
25	Galerie API 20 E utilisée pour l’identification <i>E. coli</i> ATCC 2522	46
26	Schéma de réalisation de test d’antagonisme des extraits de fromages	48
27	Evolution des paramètres (EST, MG et Protéines) au cours de l’affinage des fromages type Camembert fabriqués à partir du lait cru (CA) ou du lait pasteurisé (CI)	51
28	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC, colonne C8) des fractions hydrosolubles, au cours de l’affinage des fromages (artisanal, CA / industriel, CI) fabriqués	53
29	Electro-phorégramme en PAGE-SDS de la fraction insoluble (A) et soluble (B) à pH 4,6 au cours de l’affinage des deux fromages artisanal (A) et industriel (I).	54
30	Evolution des acides gras libres (AGL) et des indices de protéolyse aux différents stades d’affinage des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI)	56

31	Evolution des différents groupes microbiens lors de l'affinage des fromages (artisanal / industriel) fabriqués	58
32	Résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) des paramètres physico-chimiques sur la qualité des fromages fabriqués (artisanal / industriel) en fonction du stade d'affinage.	59
33	Plan factoriel 1-2 de l'analyse des composants pour les interactions des paramètres physico-chimiques pendant la maturation des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI)	60
34	Plan factoriel 1-2 de l'analyse des composants pour les interactions microbiennes pendant la maturation des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI)	61
35	Plan factoriel 1-2 de l'analyse des composants des interactions physico-chimique et microbiologique lors de l'affinage fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI).	62
36	Résultats des tests biochimiques d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (galerie API20E)	64
37	Tests d'inhibition d'activité microbienne des surnageants sur disques, bruts et neutralisés, des fromages CA (B9O et N9O) et CI (B9F et N9F)	65
38	Courbes de croissance à 37°C d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (a) et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(b) en présence des surnageants brut et neutralisé du CA	66
39	Evolution des activités anti-oxydantes des fractions solubles et insolubles lors de l'affinage des fromages type Camembert (artisanal / industriel) fabriqués	69

Liste des Abréviations	
AAL :	Acide aminé libre
AGL :	Acide gras libre
AMPs :	peptides antibactériens
ANP :	Azote non protéique
AOP:	Appellation d’Origine Protégée
ASN :	Azote soluble
ATCC :	“American Type Culture Collection”
a_w :	activité de l’eau
BHIB :	Bouillon de cœur-cervelle
BSA :	Albumine du sérum bovin
CA :	Camembert artisanal
CF :	Coliformes fécaux
CI :	Camembert industriel
CMT :	“California mastitis test”
CN :	Caséines
CT :	Coliformes totaux
β-CN :	Bêta-Caséines
αs-CN :	Alpha S- Caséines
K-CN :	Kappa-Caséines
β-Lg :	β-Lactoglobuline
α-La :	α-lactalbumine
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DSA :	Direction des services agricoles
ECA :	Enzyme de conversion de l’angiotensine
EST :	Extrait sec total
FAO :	Nations Unies pour l’alimentation et l’agriculture « Food and Agriculture Organization »
F-Ins :	Fraction insoluble
FRAP :	“Ferric reducing antioxydant power”
F-S :	Fraction soluble
FHS :	Fraction hydro-soluble
MH :	Gélose Mueller Hinton
INAO :	Institut Nationale d’Appellation de l’Origine et de la Qualité
LAB :	Bactérie lactiques
Lact-méso :	Lactobacilles mésophiles
MG :	Matières grasses
NSLAB :	« Non-Starters lactic acid bacteria »
OCDE:	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
ONS :	Office Nationale des Statistiques
PT :	Protéines totales
PS :	Protéines sériques
RP-HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance, en phase inverse

(iii)

SDS-PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du Dodécyl sulfate de Sodium
SF :	Streptocoques fécaux
Strep-méso :	Streptocoques mésophiles.
TNBS :	Acide 2, 4, 6 Trinitrobenzène sulfonique.

Introduction

Introduction

La question du lait et des produits laitiers dans notre pays occupe toujours une place capitale dans notre économie, vu que sa facture à elle seule représente, aux niveaux des importations, environ le quart de celle de l'ensemble des produits alimentaires que nous achetons de l'étranger.

En effet, avec une moyenne en lait consommé évaluée à 165 kg/ha/an de lait, l'algérien voit ses besoins se situer parmi les premiers au niveau maghrébin. Malheureusement, notre production en lait de différentes espèces ne représente que 50 à 60% des apports, bon an, mal an, d'où l'importation du reste de la balance en poudre de lait mais aussi en ingrédients de fabrications (matière grasse laitière anhydre, enzymes coagulantes, ferments lactiques, souches d'affinage ...etc).

En plus de cette exigence quantitative, le consommateur national ainsi que bon nombre d'industriels se soucient de plus en plus des aspects qualitatifs, non pas seulement pour le lait en tant que matière première, mais aussi et surtout pour les produits dérivés fabriqués, notamment les yaourts et les fromages, qui donnent l'occasion à une frange plus large de la population de prendre des protéines animales relativement bon marchés, nonobstant les sujets qui présentent une intolérance au lactose et qui ne peuvent prendre naturellement du lait frais.

Ces exigences qui recommandent de mettre sur le marché des produits répondants aux normes hygiéniques et physico-chimiques requises, se heurtent dans la réalité à la variabilité de la matière première (cas du lait recombinaé où la poudre de lait importée est de qualité fluctuante) ainsi qu'à l'influence souvent néfaste des traitements technologiques opérés sans ménagements.

Ces impondérables sont fortement marqués dans les laiteries qui se proposent de faire la transformation du lait en fromages où les produits à pâte molle sont fabriqués en plus grand nombre, vu la relative simplicité de leur processus de fabrication et leur bonne acceptabilité par les consommateurs.

En effet, pour la fabrication de ce produit dérivé, l'utilisation aléatoire du lait de collecte seul ou additionné, à différentes proportions, avec du lait recombinaé est de nature à engendrer des fluctuations sur ses caractéristiques et ses aptitudes technologiques, particulièrement aux niveaux des phases de coagulation et d'affinage.

S'ajoute à ces incidences l'effet des traitements appliqués au lait, particulièrement la pasteurisation, dont l'impact sur la réduction de la charge microbienne est recherché, mais ce traitement mal conduit ou fait déjà sur du lait recombinaé où la poudre a initialement subi un

traitement de déshydrations, engendre souvent une forte altération de la valeur nutritionnelle du produit par suite de la survenue des réactions de Maillard.

Par ailleurs, l'affinage, qui est l'étape finale de fabrication correspondant à la maturation du fromage, est prépondérant dans l'obtention d'un produit répondant aux normes de qualité. Sa maîtrise suppose celle des différents paramètres susceptibles d'agir au niveau de cette étape, en particulier ceux qui sont responsables de l'apparition des caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles recherchées.

C'est pour ces raisons que certains fromagers au niveau de la région de Tizi Ouzou, qui maîtrisent en amont les facteurs garantissant un lait de qualité, se sont proposés de réaliser des fabrications de fromages à pâtes molles type Camembert exclusivement à partir du lait cru, issu de leur ferme d'élevage.

Partant de là et afin d'apprécier à sa juste valeur cette incursion de certains artisans fromagers et évaluer l'apport et les nuisances relatives de ces fabrications au lait cru, qui existent au niveau européen et, dont la plupart sont protégés par des labels, nous avons jugé nécessaire de mener une étude comparative sur la fabrication du Camembert à partir du lait cru ou du lait pasteurisé, en ciblant préférentiellement la phase d'affinage de ces fromages.

Les objectifs assignés à cette modeste contribution peuvent être récapitulés comme suit :

- caractérisations physico-chimiques des laits et des fromages fabriqués ;
- évaluation de la phase d'affinage par le suivi de l'évolution de la protéolyse, de la lipolyse ainsi que de la succession de la microflore au cours de cette phase de maturation ;
- étude par l'analyse en composantes principales des paramètres interagissant dans l'affinage;
- enfin, évaluation des activités antibactériennes et anti-oxydantes des fractions fromagères.

Synthèse des données bibliographiques



1.1.Etat de la filière laitière en Algérie

En Algérie, la filière lait peut être définie comme l'ensemble des segments renfermant la production du lait cru, de la ferme, jusqu'au consommateur, en passant par les transformations industrielles, la distribution sur le marché et l'importation de la poudre du lait et ses dérivés (Bekhouche-Guendouz, 2011). Faute de relations bien établies entre les différents acteurs de cette filière, celle-ci fonctionne en grande partie avec de la poudre de lait importée et de la matière grasse laitière anhydre auxquels il faut rajouter d'autres ingrédients de fabrication (levains, enzymes coagulantes, lactosérum, arômes, etc.) (Souki, 2009 ; Kacimi-El hassani, 2013 ; ONS, 2018).

Du fait des traditions alimentaires, l'Algérie est considérée parmi les grands pays consommateurs de lait et de ses dérivés. Elle est classée 1^{ère} au Maghreb avec un total de 7 à 10% du total des importations mondiales en poudre de lait et dérivés. Notre pays est le second importateur mondial de poudres et dérivés après la Chine (Benyagoub et Mohammed, 2014 ; Hamiroune *et al.*, 2014 ; OCDE/FAO, 2016). La consommation algérienne du lait et des produits laitiers a connu une importante croissance depuis l'indépendance. Elle est passée de 35 kg/habitant/an en 1963 à 157 kg/habitant/an en 2016 (Lazereg *et al.*, 2020). Cette augmentation est le fruit de la politique de subvention à la consommation engagée par l'Etat pour réduire un tant soit peu le déficit en protéines animales, vu que celles provenant notamment des viandes et poissons sont nettement plus coûteuses (Padilla *et al.*, 2001 ; Kaouche-Adjlane *et al.*, 2015 ; Makhlouf *et al.*, 2015).

1.1.1. Evolution de la production et importations des produits laitiers

Selon Meslem (2019), la production nationale en lait cru est estimée à 3,6Milliard de litres, alors que la demande nationale pour couvrir tous les besoins du pays est estimée à 5 Milliards de litres. La production actuelle en lait cru couvre 60 % des besoins. Les 40 % restants sont compensés par l'importation de poudres de lait (Bessaoud *et al.*, 2019).

La production laitière a connu un accroissement depuis le lancement, en 2000, du plan national de développement agricole (P.N.D.A), avec une évolution remarquable entre 2009 et 2015 (Hadji-Kouiddri *et al.*, 2018 ; Kalli *et al.*, 2018) (Tableau I). Cette période est suivie par une diminution, qui peut s'expliquer par deux phénomènes distincts mais complémentaires : d'un côté, les coûts de productions élevés au niveau des élevages, exacerbés par la sécheresse qu'a connue le pays (ce qui a entraîné un délaissement de l'activité) et, de l'autre, la baisse brutale des prix sur le marché mondial de la poudre, ce qui a incité les laiteries à s'approvisionner sur le marché mondial au détriment du lait local (Djermoun et Chehat, 2012 ; Makhlouf et Montaigne, 2017 ; Lazereg *et al.*, 2020).

1.1.2. Etat du cheptel laitier

La production laitière en Algérie est assurée à hauteur de 80 % par le cheptel bovin, qui reste cantonné au nord (avec 53, 24 et 23 respectivement, à l'est, à l'ouest et au centre du pays). L'élevage des petits ruminants, notamment ovins, caprins et camelins se concentre dans les aires steppiques (Bencharif, 2001 ; Bekhouche-Guendouz, 2011) (Figure 01).

Tableau I : Evolution de production des produits laitiers en Algérie (source : ONS, 2020)

Produit	Lait pasteurisé (10 ³ L)	Fromages (T)	Beurre et Smen (T)	Autres dérivés du lait (10 ³ L)
Année				
2010	6721,8	2366,4	902,3	189,9
2011	8498 ,9	3809,3	1850,6	225,3
2012	8581,1	7044,7	1201,7	264,3
2013	9294 ,8	4603,7	1522,0	274,2
2014	9852,9	5451,4	2510,8	254,8
2015	9992,5	4991,9	2718,4	321,4
2016	10124,8	5001,6	3286,2	308,6
2017	10015,9	4375,0	2478,4	275,8
2018	11051,2	4464,5	1916 ,7	284,1
2019	11877,3	4804,8	2243,6	391,1

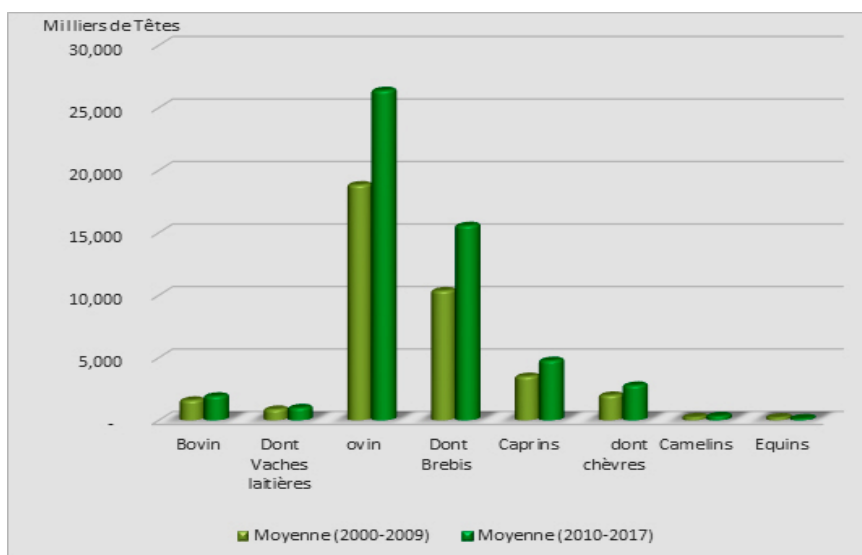


Figure 01 : Evolution du cheptel en Algérie durant les années du 2000à 2009
(source : MADR, 2018)

1.1.3. Etat de la filière lait au niveau de la wilaya Tizi-Ouzou

De par sa vocation, la wilaya de Tizi-Ouzou recèle un potentiel productif bovin important, évalué à 70 274 têtes en 2014, dont 30 358 vaches laitières (soit environ 43,2 %) dont 65 % de l'effectif total sont des populations locales (Sétifiène et Guelmoise) et le reste sont des races laitières importées hautement productives (Montbéliard, Holstein, etc.) (Makhlouf, 2015).

Au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou, la production laitière a atteint 144,65 millions de litres en 2014, ce qui représente plus de 4 % de la production nationale, la plaçant ainsi au 5^{ème} rang. Le taux de collecte du lait est considéré comme l'un des plus élevés du pays (2^{ème} place), il est passé de 37 % en 2009 à plus de 73 % en 2014, mais le taux d'intégration du lait

cru demeure relativement faible (6 à 10 %) (Makhlouf et Montaigne, 2017). Selon les données statistiques de la direction des services agricole de la wilaya de Tizi-Ouzou en 2018, l'effectif du cheptel est de 10524 bovins, 133 669 ovins et 38 829 caprins. La production du lait cru a été estimée à 145 755900 litres, avec 32 laiteries, d'une capacité de 130 8375 L/j et 19 centres de collecte d'une capacité de 126 480 L/j (DSA, 2018).

1.1.4. Principales contraintes de la production laitière

Le problème majeur que rencontre la production laitière est lié à l'alimentation du bétail qui constitue le premier poste de dépense pour les éleveurs (Madani *et al.*, 2004). Les ressources fourragères en Algérie se composent essentiellement des chaumes de céréales, de la végétation de jachères pâturées, des parcours steppiques, forêts, maquis et d'un peu de fourrages cultivés. Le déficit fourrager est de 58% en zone littorale, 32% en zone steppique et 29% au Sahara (Makhlouf *et al.*, 2017). L'adaptation insuffisante des races laitières importées est aussi avancée comme étant la cause principale de la productivité limitée des animaux (Srairi *et al.*, 2007 ; Madani et Mouffok, 2008 ; Ghazi et Niar, 2011 ; Djermoun et Chehat, 2012 ; Chemma, 2017 ; Ouarfli et Chehma, 2018).

La concurrence avec le lait local ne se fait pas de façon loyale, en raison des subventions dont bénéficient les utilisateurs de la poudre importée. Les laiteries gagnent de ce fait plus à utiliser de la poudre de lait que du lait cru. La poudre de lait importée ne concurrence pas le lait local en termes de prix seulement, mais aussi en terme de qualité et de disponibilité sur le marché. Les produits importés présentent certains avantages comme la longue conservation et la facilité d'utilisation où ils répondent mieux aux besoins des utilisateurs (Kali *et al.*, 2011 ; Djermoun, 2011).

1.2. Protéines du lait

Le lait est constitué de deux fractions protéiques principales, séparables par leur solubilité à pH 4,6, d'une part, les caséines (fraction majeure représentant 80% des protéines) qui précipitent à ce pH et, d'autre part, les protéines sériques qui restent solubles et qui constituent 20% du total protéique (Guillou *et al.*, 1986).

1.2.1. Protéines sériques

Dans le lait bovin, elles représentent 5-7 g/L. Elles regroupent différentes entités ayant une bonne valeur nutritionnelle et dotées d'activités biologiques variées. Parmi ces protéines, nous retrouvons principalement la β -Lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La), les immunoglobulines (Ig), l'albumine sérique bovine (BSA) et les protéose-peptones (PP). D'autres protéines et enzymes sont aussi présentes mais à des proportions plus réduites (Brulé *et al.*, 1997).

1.2.2. Caséines

1.2.2.1. Composition et caractéristiques générales

Les caséines (CN) sont des phosphoprotéines dont la teneur est estimée dans le lait de vache à 25-30 g/L. Cette fraction est déterminante en technologie, car elle permet la production du fromage, après coagulation du lait et maturation de ce coagulum.

Les poids moléculaires de ces caséines restent très proches les uns des autres. Les CN sont des holoprotéines, sauf la CN- κ qui possède un groupement prosthétique glucidique. La présence des groupements phosphoséryls confère aux CN une très grande affinité vis-à-vis de certains minéraux (calcium et magnésium...). Les groupements phosphoséryls forment des segments peptidiques à caractère acide et hydrophile notamment entre les acides aminés 61 et 80 pour la CN- α_{s1} et entre les acides aminés 1 et 20 pour la CN- β (Garnier *et al.*, 1968 ; Fox et Mulvihill, 1982 ; Farrell *et al.*, 2004 ; Lucey *et al.*, 2017 ; Lucey *et al.*, 2018).

1.2.2.2. Organisation de la micelle

Selon plusieurs auteurs (McMahon et Brown 1984 ; Swaisgood, 1993 ; Lucey *et al.*, 2017), les micelles de CN sont des structures supramoléculaires, assimilées à des colloïdes en suspension dans le lait, qui résultent de l'association de quatre types de CN: α_{s1} , α_{s2} , β et κ , en proportion moyenne de 4/1/4/1, respectivement. On retrouve aussi parmi les composants de ces micelles, quelques fragments peptidiques (CN- λ issus de la protéolyse de la CN- β par la plasmine) et des composants salins dont les principaux sont le calcium et le phosphore (8%) (Tableau II).

La composition et le diamètre des CN varient avec l'espèce, la race, l'individu, le stade de lactation et la saison (Walstra, 1990 ; DeKruif *et al.*, 2012). Les micelles de CN sont responsables de l'aspect blanc turbide du lait et sont sécrétées par l'appareil de Golgi aux niveaux des glandes mammaires (Farrell *et al.*, 2006a ; Farrell *et al.*, 2006b).

Tableau II : Composition moyenne de la micelle de caséines (g/100g) (Schmidt, 1980).

Caséines		Composants salins	
α_{s1}	33	Calcium	2,9
α_{s2}	11	Magnésium	0,2
β	33	Phosphate inorganique	4,3
κ	11	Citrate	0,5
λ	4		
Total caséines	92	Total composants salins	8,0

Les caractéristiques physiques des micelles leur confèrent une très grande stabilité en milieux aqueux (Tableau III). Le fort pouvoir d'hydratation et la masse volumique légèrement supérieure à celle de l'eau limitent le phénomène de décantation. De plus, leur potentiel de surface (potentiel zêta d'environ -20 mV à l'état natif) élevé assure des répulsions entre micelles de caséines. Les principales caractéristiques des caséines sont rassemblées dans le tableau IV.

Les caséines sont très thermostables et peu résistantes à la protéolyse (Sicherer et Sampson, 1999 ; De Kruif *et al.*, 2012), du fait de leur structure peu ordonnée. Elles sont fortement hydrophobes (selon l'ordre $\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$), amphiphiles et à conformation ouverte, ce qui influence leurs propriétés fonctionnelles (Fox, 1989). Caroli *et al.* (2009) ont constaté que les polymorphismes des CN affectent les propriétés de transformation du lait et de fabrication du fromage ainsi que leur digestibilité dans l'alimentation humaine.

Tableau III : Caractéristiques principales de la micelle de caséine à l'état natif, à température ambiante.

Paramètres	Valeurs
Diamètre moyen (nm)	50 - 150 ^(d)
Surface (cm ²)	8 x 10 ^{-10(c)}
Volume (mL)	2,1 x 10 ^{-15(c)}
Densité (hydraté)	1,0632 ^(c)
Hydratation (g H ₂ O/g de protéines)	3 - 3,5 ^{(a), (b)}
Voluminosité (mL/g de protéines)	1,5 - 7,1 ^{(l), (f)}
Poids moléculaire (hydraté)(Da)	1,3 x 10 ^{9(c)}
Poids moléculaire (déshydraté) (Da)	5 x 10 ^{8(e)}
Teneurs en eau (%)	63 ^(c)
Nombre de caséines/micelle	2.10 ⁴ - 15.10 ^{4(j)}
Nombre de micelles/L de lait	10 ¹⁴ -10 ¹⁶⁽ⁱ⁾
Distance moyenne entre les micelles (nm)	240 ⁽ⁱ⁾
Surface micellaire (cm ² /mL de lait)	5 x 10 ⁴⁽ⁱ⁾
Masse de minéraux (g/kg micelles)	0,8 ^(k)

^(a) Dalglish (2011); ^(b) Holt (1996); ^(c) Kirchmeir (1973); ^(d) McMahon et McManus (1998); ^(e) Morr *et al.*, (1973); ^(f) Nobel *et al.*, (2012); ⁽ⁱ⁾ Schmidt *et al.*, (1974); ^(j) Schmidt (1980); ^(k) Tsioulpas *et al.*, (2007); ^(l) Walstra (1979).

Tableau IV : Principales caractéristiques des caséines du lait de vache (Swaigood, 2003 ; Caroli *et al.*, 2010; Gallinat *et al.*, 2013 ;Huppertz *et al.*, 2018).

	CN- α_{s1}	CN- α_{s2}	CN- β	CN- κ
Proportion moyenne (%)	36	10	34	13
Taux (g/L)	9,5	2,7	9,0	3,5
Principaux variants génétiques	10 (A-J)	5 (A-E)	15 (A-I)	13 (A-J)
Résidus d'acides aminés (nombre /mole)	199	207	209	169
Poids moléculaire (Da)	23600	25200	24000	19000
Résidus cystéines (nombre/mole)	-	2	-	2
Groupe ment phosphoséryls (nombre/mole)	8-9	10-13	5	1
Glucides (%)	0	0	0	5
Hydrophobicité (Kj/résidus)	4,9	4,65	5,6	5,1
Charge à pH 6,6	- 20,9	- 14,8	- 12,3	- 3,0
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	+++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

L'organisation de la micelle est toujours du domaine de l'hypothèse et de nombreux modèles ont été proposés (Schmidt, 1982; Walstra et Jenness, 1992 ; Holt, 1992; Holt et Horne, 1996; McMahon et McManus, 1998). Le modèle à sous-unités proposé par Schmidt (1980, 1982) s'appuie sur des observations en microscopie électronique (Figure 02), qui repose sur l'existence de sub-micelles de CN, qui s'associent par pontage phosphocalcique. Ce model reste l'un des plus admis, car il répond au comportement des caséines dans divers conditions (action enzymatique de la chymosine immobilisée, fixation de la β -lactoglobuline et surface induite par des traitements thermiques excessifs, etc.) (Holt, 1992). Ces sous-unités sont associées les unes aux autres par des interactions de type hydrophobe, électrostatique et hydrogène et par des clusters de phosphate de calcium.

La charge négative de la surface de la micelle est en partie responsable des répulsions électrostatiques entre les micelles et contribue au maintien de la dispersion malgré la forte densité de population des micelles et la faible distance entre les particules. La composition de surface des micelles de CN fait quant à elle, l'objet d'un certain consensus. Il est communément admis que la CN- κ est située majoritairement en surface des micelles, avec une partie hydrophile C-terminale qui s'étend dans la phase aqueuse du lait. Cette partie hydrophile agit à la manière des brosses d'un poly-électrolyte (Horne, 1986) et assure une stabilisation des micelles de caséines par des phénomènes de répulsions électrostatiques et stériques. La CN- κ constitue donc « la chevelure » stabilisante de la micelle (Walstra, 1990 ; De Kruif et Zhulina 1996 ; De Kruif, 1998).

Bien que non majoritaire dans la micelle, la CN- κ est la protéine laitière qui détient le rôle clé dans la coagulation du lait par la présure (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989; Hallen *et al.*, 2010). Il semblerait que la CN- κ ne recouvre pas entièrement la surface de la micelle de CN. D'autres caséines (α_{s1} , α_{s2} et β) seraient alors également situées à la surface et donc exposées à la phase aqueuse (Dalglish, 1998 ; Dalglish *et al.*, 2004).

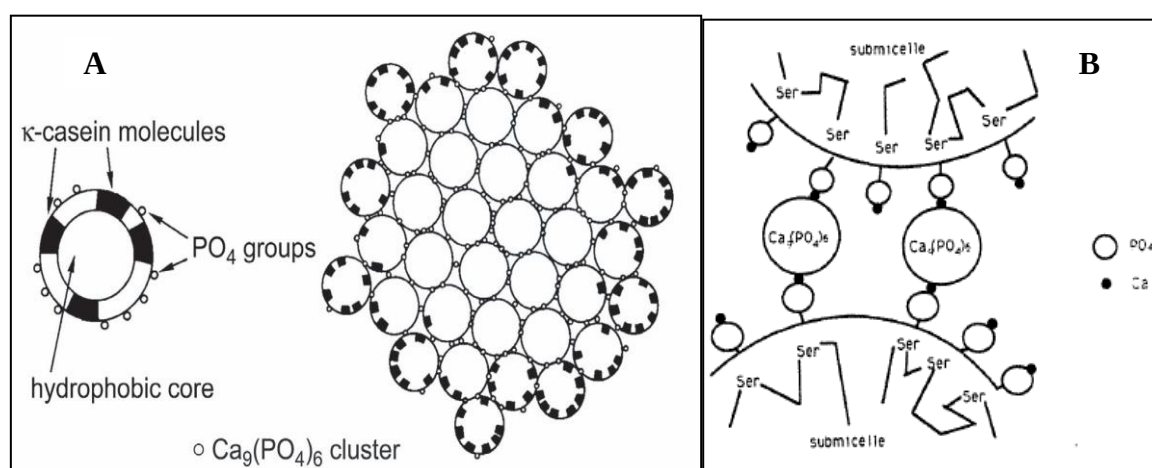


Figure 02: Modèle sub-micellulaire des micelles de caséine montrant les structures protéiniques et la disposition de la surface de la caséine κ (A) et pontage de deux sub-micelles par le phosphate de calcium (B) (Schmidt, 1982).

1.3. Technologie fromagère

1.3.1. Définition

Selon la norme du *codex alimentarius* (STAN A-6 -1978 amendé en 2006), « le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi dure, dure ou extra dure, obtenu après coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème, crème de lactosérum ou babeurre, seuls ou en combinaison, qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum / caséines ne dépasse pas celui du lait ».

Le fromage affiné est un produit de la coagulation qui est maintenu pendant un certain temps dans des conditions d'humidité et de température nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage. Le fromage affiné aux moisissures est un fromage où l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques, dans la masse et/ou à la surface du fromage. Le fromage non affiné (dont le fromage frais) est un produit de la coagulation acide qui est prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication (FAO/OMS, 2007).

1.3.2. Classification

Les normes du codex alimentaire CODEX STAN A-6-1978 amendé en 2006, classent les fromages selon trois critères (Tableau V):

- selon la fermeté (Formule I) qui appartient à l'intervalle de 69 à 51 % où la pâte molle évolue jusqu'à la pâte extra dure. Cette classification est déterminée selon la teneur en eau dans le fromage dégraissé (TEFD) ;
- la teneur de la matière grasse par rapport à l'extrait sec total (MG/ES) (Formule II) ;
- le type d'affinage du fromage (Formule III) où les fromages sont classés en trois catégories différentes.

Tableau V: Classification des fromages en fonction de la consistance, de la teneur en matière grasse et des principales caractéristiques d'affinage.

Formule I		Formule II		Formule III
TEFD (%)	Dénomination	MG/MS (%)	Dénomination	Dénomination d'après les principales caractéristiques d'affinage
<51	Pâte extra dure	>60	Extra gras	1-Affinage -Principalement en surface -Principalement dans la masse 2-Affiné aux moisissures -Principalement en surface -Principalement dans la masse 3-Frais
49-53	Pâte dure	45-60	Tout gras	
54-63	Pâte demi dure	25-45	Mi gras	
61-69	Pâte demi molle	10-25	Quart gras	
>67	Pâte molle	<10	Maigre	

TEFD : pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraissé ; MG/ES : pourcentage de la matière grasse dans l'extrait sec

1.3.3. Notion de terroir et appellation d'origine

Depuis des temps très lointains, la fabrication des fromages a été rendue possible pour prolonger initialement la durée de conservation du lait, avant que des innovations ne soient opérées peu à peu pour arriver à la fabrication de fromages divers et variés issus de matières premières de différentes espèces (vache, brebis, chèvre, bufflone...) et en utilisant à bon escient les bactéries lactiques (LAB), les enzymes coagulants, les sels, les agents de

l'affinage...etc. Ce savoir-faire progressif a permis entre autre d'obtenir des produits ayant des caractéristiques organoleptiques recherchées, tels que nous les connaissons de nos jours (Olson, 1990).

La variabilité dans ces productions se situe à trois niveaux : alimentation des animaux, espèce et race des animaux producteurs de lait et enfin la flore de fermentation et d'affinage (Berard et Marchenay, 2007).

Le terroir pour le lait et le fromage est une aire géographique caractérisée par des conditions de milieu et des types d'animaux qui, exploités par l'homme, conduisent à des produits spécifiques (Grappin et Coulon, 1996). Chaque fromage traditionnel provient de systèmes complexes qui lui donnent des caractéristiques organoleptiques particulières (Dorioz *et al.*, 2000).

Contrairement aux marques commerciales, les fromages bénéficiant de dénomination d'origine protégée (DOP) reflètent un patrimoine collectif, et ils sont produits selon des cahiers de charges très strictes. L'idée de protéger et de préserver les traditions, la diversité des aliments, y compris le fromage, a pris naissance à la convention de Paris en 1883 où le terme Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) a été introduit pour reconnaître l'héritage spécifique des produits alimentaires provenant de régions, tout en garantissant l'authenticité du produit. Dans un premier temps, les AOC sont apparues en France avant que celles-ci ne soient englobées dans leur très grande majorité sous les Appellation d'Origine Protégée (AOP) et Indication Géographique Protégée (IGP) reconnues au niveau européen (Bertozzi et Panari, 1993 ; McSweeney *et al.*, 2004).

En Algérie, quelques études ont été consacrées aux fromages traditionnels, dont notamment Klila et Djben, parmi les plus connus. D'autres le sont moins, à l'instar de : Takammérite et Aoules (au sud), Igounanes (en Kabylie), Michouna, Medghissa et Bouhezza (Région de Chaouia). Ce dernier est le seul fromage traditionnel affiné (Aissaoui *et al.*, 2011 ; Derouiche et Zidoune, 2015 ; Leksir et Chemmam, 2015 ; Meribai *et al.*, 2016).

1.3.4. Etapes principales de la fabrication des fromages

Dans la majorité des cas, la transformation du lait en fromage nécessite trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La coagulation du lait conduit à la formation d'un réseau nommé gel ou coagulum. L'égouttage, ou synérèse, permet au lactosérum contenu dans le gel d'être évacué en grande partie et donc de former le caillé. L'affinage, pour sa part, englobe une multitude de réactions de digestion enzymatique des constituants du caillé qui confère à chaque fromage une typicité au niveau de la texture, de l'aspect et de la flaveur (Mietton *et al.*, 1994).

1.3.4.1. Coagulation

La coagulation du lait, qui se traduit par la formation d'un gel ou coagulum, résulte des modifications physico-chimiques de la micelle de caséines. Ces modifications sont induites, soit par acidification, soit par action d'enzymes coagulantes, ou par l'action combinée des deux (Gunasekaran et Ak, 2002 ; St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

1.3.4.1.1. Coagulation par voie enzymatique

Elle correspond à une déstabilisation des micelles de CN qui flocculent puis se soudent pour former un gel. Il y'a un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale (veau, taurillons, porc et poulets), végétale (artichaut, chardon) ou microbienne (*Kluyvermyces*, *Mucor miehi*, *Mucorpusills* et *Endothia parasitica*), qui ont la propriété de coaguler le lait. Cependant, cette propriété ne suffit pas à les rendre aptes à produire des fromages de qualité. Il faut tenir compte de l'activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur permet d'hydrolyser les CN α s et β , avec libération de peptides (Dalgeish, 1982 ; Ramet, 1985, 1987).

La présure d'origine animale, constituée principalement de chymosine et de pepsine, est le coagulant le plus utilisé en technologie fromagère. Elle possède une activité très spécifique sur la CN- κ , tout en amorçant l'affinage en s'attaquant préférentiellement à la CN- α_{s1} (Aworth et Muller, 1987 ; Dalgleish, 1992 ; Brulé *et al.*, 1997 ; Mahaut *et al.*, 2000 ; Cavalcanti *et al.*, 2004). L'action de la chymosine comporte en fait une phase primaire (hydrolyse) et une phase secondaire (agglomération) (Figure 03).

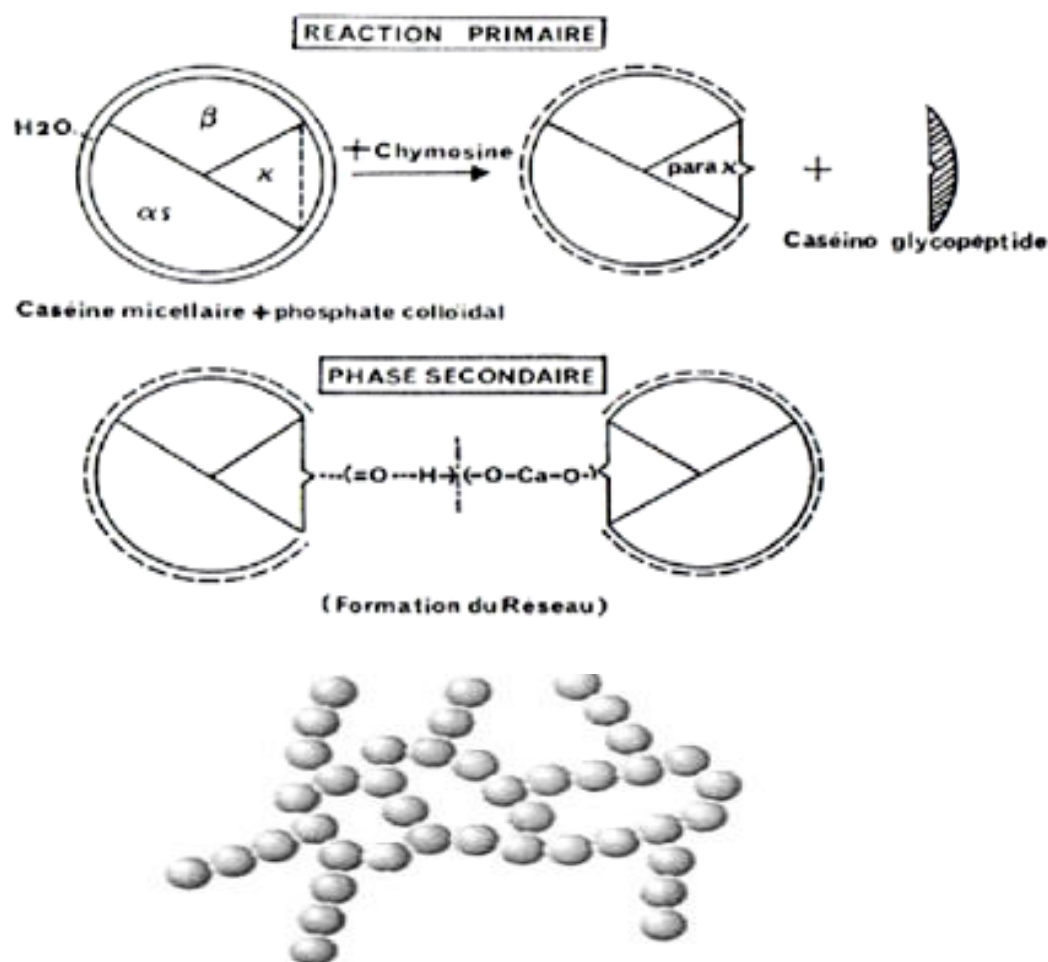


Figure03:Phases de la coagulation enzymatique du lait et formation du réseau (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

1.3.4.1.1.1. Phase primaire

Elle concerne l'hydrolyse de la CN- κ , au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ située entre la zone hydrophobe et la zone hydrophile de la protéine. Il résulte de cette hydrolyse, la production de deux segments : la para-caséine- κ (segment N-terminal 1-105) qui est hydrophobe et basique et le caséino-macro peptide (CMP: segment C-terminal 106-169), qui est hydrophile et acide. La para-caséine κ reste accrochée à la micelle tandis que le CMP est libéré dans le lactosérum (Sandra *et al.*, 2007 ; Dalgleish et Corredig, 2012).

La libération du CMP conduit à une perte de près de 30% d'hydratation des CN et une réduction de la charge nette des micelles (de -20 mV à -8 mV) et, par conséquent, une diminution des répulsions électrostatiques qui, à l'état initial, contribuent à la stabilité du système colloïdal (Green et Morant, 1981; Dalgleish, 1983; Carlson *et al.*, 1987 ; Ilboudou *et al.*, 2012).

1.3.4.1.1.2. Phase secondaire

C'est une étape d'agglomération. Lors de cette phase, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes par intervention des ions calcium qui s'unissent à la partie chargée négativement des micelles. Cela provoque la diminution des forces de répulsions électrostatiques entre les micelles et favorisera leurs agglomérations en entraînant la formation d'un réseau protéique lâche qui retient les globules gras, l'eau et les constituants solubles (Walstra, 1990 ; Mietton *et al.*, 2004). Le gel présure obtenu est fortement minéralisé, cohésif et doté d'une forte capacité de synérèse (Mietton *et al.*, 1994, St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

1.3.4.1.2. Coagulation par acidification

La coagulation est obtenue par une acidification lente par voie fermentaire en utilisant des bactéries lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par voie chimique acidogène avec la glucono-delta-lactone qui est hydrolysée en acide gluconique (Brulé *et al.*, 1997 ; Lucey et Singh, 1998). Si la micelle de caséine est très stable au pH du lait, sa structure devient instable au fur et à mesure de l'acidification (Cayot et Lorient, 1998).

En effet, l'acidification du lait diminue le pouvoir séquestrant de la CN- β , la dépolymérisation de la CN- α_s et une diminution du caractère amphiphile de CN- κ , ce qui augmente la solubilité du phosphate de calcium qui se déplace vers la phase aqueuse. Jusqu'à un pH de 5,2, la solubilisation du phosphate inorganique ne provoque pas de modifications majeures de la micelle mais au pH isoélectrique de la micelle (pH4,6), la solubilisation du phosphate de calcium est totale et entraîne un affaiblissement des liaisons hydrophobes des micelles (Phadungath, 2005).

L'augmentation de la force ionique de la phase aqueuse affaiblit les répulsions électrostatiques entre les caséines, provoquant leur dissociation en sous-unités suivie d'une floculation. Au cours de cette phase, les CN interagissent et forment, au repos, un gel homogène qui emprisonne le lactosérum et occupe entièrement le volume du lait en formant un gel déminéralisé, friable et fragile (Figure 04) (Davies et Whate, 1960 ; Brulé *et al.*, 1974; Darling et Diskon, 1979 ; Brulé *et al.*, 1997 ; Fox et McSweeney, 1998).

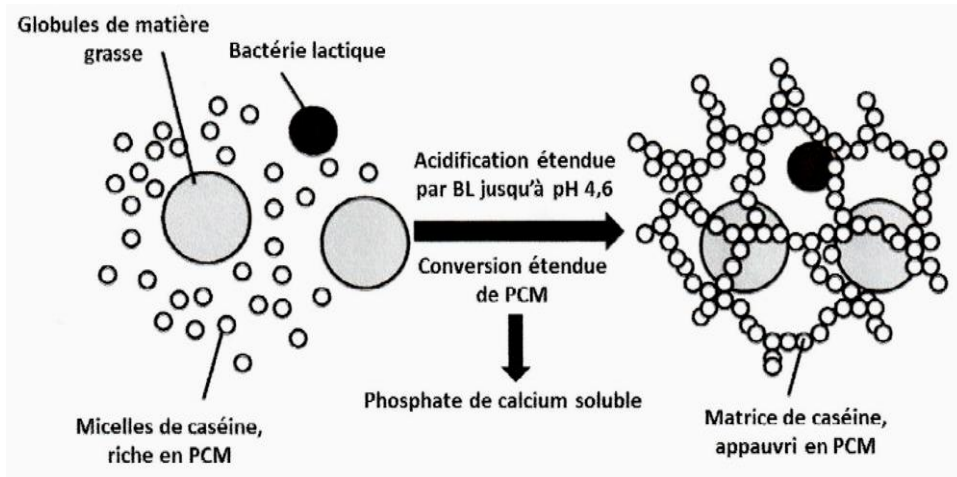


Figure 04: Représentation schématisée du processus de coagulation du lait par acidification (Kindstedt, 2014). PCM : phosphate de calcium micellaire ; BL : bactérie lactique

1.3.4.1.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification lactique. Elle est à l'origine de la fabrication de nombreux fromages. Dans la pratique industrielle, un gel mixte peut être obtenu selon deux techniques : l'emprésurage d'un lait acide ou l'acidification d'un gel présuré. Les fromages à pâte molle sont en général faiblement minéralisés car l'emprésurage du lait se fait à 23-28°C ; le pH est alors de 6,20 à 5,85. Le temps total de coagulation va de 30 à 45 minutes pour des temps de prise courts (6-8 minutes). Le coagulum obtenu présente des caractéristiques intermédiaires entre ceux des gels lactique et présure : souplesse et constructibilité moins grandes, fermeté et friabilité plus accentuées que celles du gel présure. Les facteurs influençant la coagulation sont nombreux : la composition du lait, la concentration en enzymes, la température d'emprésurage et les traitements technologiques, etc (Veissyere, 1975 ; Larpent et Bourgeois, 1989).

1.3.4.2. Egouttage et moulage

L'égouttage du coagulum est un phénomène dynamique qui se fait de manière spontanée. Il conduit à la concentration de certains constituants du coagulum par phénomène physique de rétraction (synérèse), qui s'accompagne de l'expulsion passive du lactosérum liée à la porosité et à la perméabilité du coagulum. L'évacuation du lactosérum conduit à la formation du caillé (Colin, 1990 ; Walstra, 1993 ; Fox et McSweeney, 2004 ; Mateo *et al.*, 2009 ; Abbas, 2012). Le débit volumique de lactosérum expulsé ($V \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) pendant l'égouttage peut être exprimé en fonction de la loi de Darcy :

$$V = \frac{A}{R} \times \frac{\Delta P}{\eta} \text{ (Jeantet et al., 2008)}$$

ΔP : différence de pression s'exerçant sur le gel (Pa),

η : viscosité du lactosérum (Pa.s),

R : résistance hydrodynamique du gel (m^{-1}),

A : surface du gel (m^2).

En conséquence, l'élimination du lactosérum dépend du type de coagulation mis en jeu et sa porosité. Le coagulum lactique est plus perméable tandis que les coagulums emprésurés doivent subir des actions mécaniques (brassage, tranchage, pressage) et physique (cuisson) pour permettre leur égouttage (Ramet, 1997 ; Everard *et al.*, 2008). La cinétique d'expulsion en moule est décrite par l'équation suivante :

$$V_t = V_0 \left(1 - e^{-\frac{p \cdot g \cdot t}{\eta \cdot R}} \right)$$

Dont :

V_t : volume de lactosérum expulsé du moule au temps t ,

V_0 : volume du mélange caillé/lactosérum à t_0 ,

P : masse volumique du lactosérum,

g : accélération de la pesanteur,

η : viscosité du lactosérum

R : résistance hydrodynamique du gel

Dans ce cas, la résistance à l'écoulement augmente sous l'effet de l'obstruction des perforations des moules par les grains du caillé, ce qui nécessite le retournement régulier du fromage afin de favoriser la cinétique d'égouttage (Jeantet *et al.*, 2007). La texture finale de la pâte fromagère est directement liée aux mécanismes de coagulation et de l'égouttage utilisés lors de la fabrication (Almena-Aliste et Mietton, 2014) (Figure 05).

1.3.4.3. Salage et ressuyage

Le salage est une étape indispensable à la fabrication des produits affinés. Il s'effectue après le démoulage et permet de compléter l'égouttage, de contribuer à la formation de la croûte et au développement des propriétés sensorielles.

Cette opération permet aussi de diminuer l'activité de l'eau à l'intérieur du produit fini (Schroeder *et al.*, 1988 ; Mistry et Kasperson, 1998), car l'absorption du sel dans la matrice fromagère engendre une migration des molécules d'eau vers la surface afin d'équilibrer la pression osmotique entre la phase aqueuse de l'aliment et le milieu salé. De façon générale, la perte d'eau est de 2 à 2,5 fois plus grande que la quantité de sel absorbée (p/p).

Le salage contribue enfin à orienter la sélection et la régulation de la flore d'affinage (Hardy, 1997) et à inhiber ou à réguler l'activité enzymatique. C'est le cas de *Geotrichum candidum* qui est inhibée par le sel sans affecter l'activité de *Penicillium* (Mansour et Alais, 1972 ; Guéguen et Schmidt, 1992).

Il existe deux procédés de salage : le salage par saumure pour lequel les fromages sont immergés dans une solution saturée en NaCl et le salage à sec ou saupoudrage. Pour les productions fermières, les fromages sont salés à la main contrairement aux productions industrielles où cette étape est mécanisée. Le ressuyage est une étape qui démarre après le salage. Il consiste à mettre les fromages dans un local dédié au séchage (séchoir). Son but est de diminuer d'avantage l'humidité du fromage avant qu'il ne soit transféré dans la cave d'affinage.

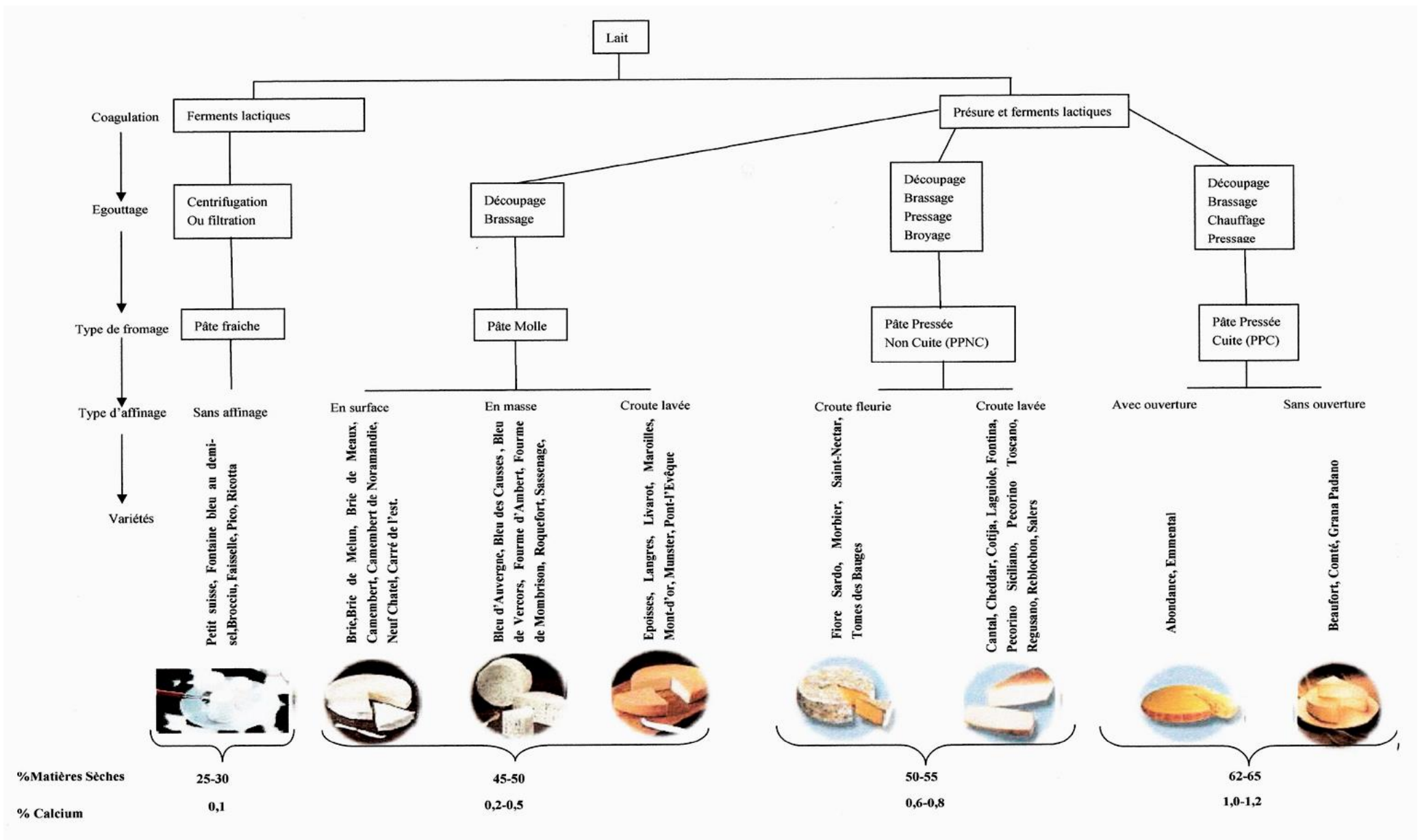


Figure 05: exemple de classification des fromages selon Almena-Aliste et Mietton (2014).

1.3.4.4. Affinage

C'est l'étape la plus complexe et la plus longue de la fabrication des fromages affinés qui détermine les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de chaque produit fini (Bennett et Johnston, 2004). C'est un processus biochimique complexe et long qui correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé par les différents agents d'affinage : les enzymes endogènes du lait, les enzymes coagulantes (présure, enzymes microbiennes), microflore lactique originaire ou non, des levains, microflore non lactique et la flore fongique. Ces diverses réactions biochimiques donneront les caractéristiques organoleptiques et texturales du fromage (Fox *et al.*, 1993 ; Molimard *et al.*, 1995 ; Choisy *et al.*, 1997 ; Fox et McSweeney, 2004 ; Jeantet *et al.*, 2008 ; Jeantet *et al.*, 2017). La durée d'affinage varie selon le type du fromage, elle dure quelques semaines à deux ans ou plus, sous des conditions appropriées pour chaque fabrication (Fox *et al.*, 1994).

1.3.4.4.1. Microbiologie de l'affinage

Le fromage est considéré comme un écosystème complexe de par la diversité de son microbiote car il est le siège d'un développement important de microorganismes. Les bactéries, les moisissures et les levures cohabitent sur la croûte et à l'intérieur du fromage. Ces microorganismes appartiennent à des groupes ou à des espèces très diverses et sont originaires de plusieurs sources : le lait, les levains, le salage, l'atmosphère des locaux, etc. (Figure 06) (Michel *et al.*, 2001 ; Morel, 2012).

Deux catégories de microorganismes sont présentes en technologie fromagère : la flore des ferments lactiques et la flore secondaire. Les bactéries des ferments sont impliquées à la fois dans l'acidification et dans la maturation des fromages, alors que la flore secondaire est principalement impliquée dans l'affinage (Figure 07). Cette dernière regroupe les bactéries lactiques désignées par NSLAB (*Non-Starters Lactic Acid Bacteria*), les bactéries de surface, les bactéries propioniques, les levures et les moisissures (Beresford *et al.*, 2001). Dans le cas des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, la flore d'affinage est composée essentiellement de bactéries lactiques, de bactéries de surface, de levures et de moisissures.

Les bactéries du type NSLAB constituent une partie de la flore native du lait, qui résiste à la pasteurisation ou présentes dans les fromages suite à une contamination après pasteurisation (Martley et Crow, 1993). Ces bactéries sont les *Pediococcus* ainsi que certaines espèces de *Lactobacillus* mésophiles homo- ou hétéro-fermentaires (*Leuconostoc ssp*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei...*etc) (Jordan et Cogan, 1999 ; Lynch *et al.*, 1999 ; Fitzsimons *et al.*, 2001 ; Garabal, 2007 ; Bove *et al.*, 2012 ; Porcellato *et al.*, 2013 ; Frohlich-Wyder *et al.*, 2015 ; Gobbetti *et al.*, 2015).

Le rôle principal des ferments, comprenant une seule ou plusieurs espèces, est de mener à terme les fermentations souhaitées dans le produit fini (Leroy et DeVuyst, 2004 ; Van HylckamaVlieg et Hugenholtz, 2007 ; Carminati *et al.*, 2010). Les bactéries majeures des ferments lactiques comprennent des souches, plus ou moins acidifiantes telles que *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus* *ssp* (Garabal, 2007). De par leurs propriétés (acidifiantes et protéolytiques), elles jouent un rôle fondamental dans le processus de transformation du lait et du caillé en fromage affiné.

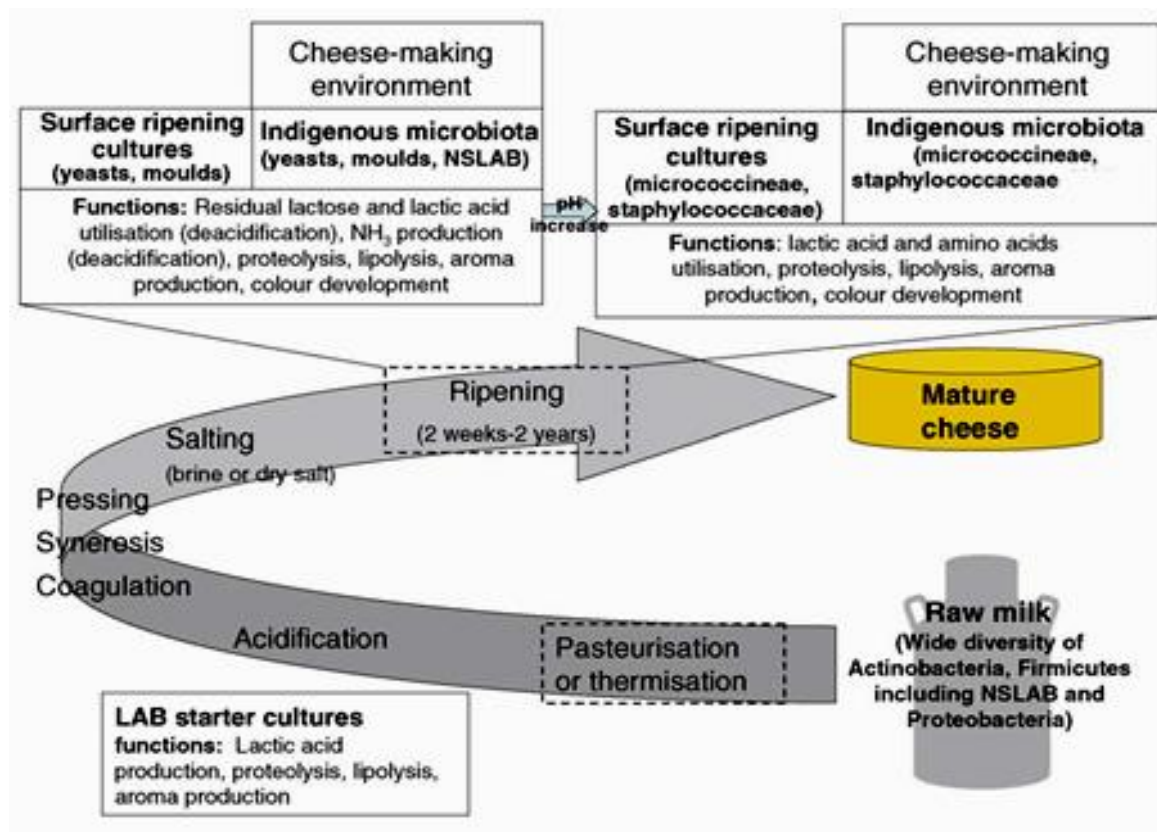


Figure 06: représentation schématique de la succession des principaux groupes microbiens au cours de la fabrication des fromages (Irlinger et Mounier, 2009).
LAB : bactéries lactiques ;SLAB : starter lactic acid bacteria; NSLAB non starter lactic acid bacteria

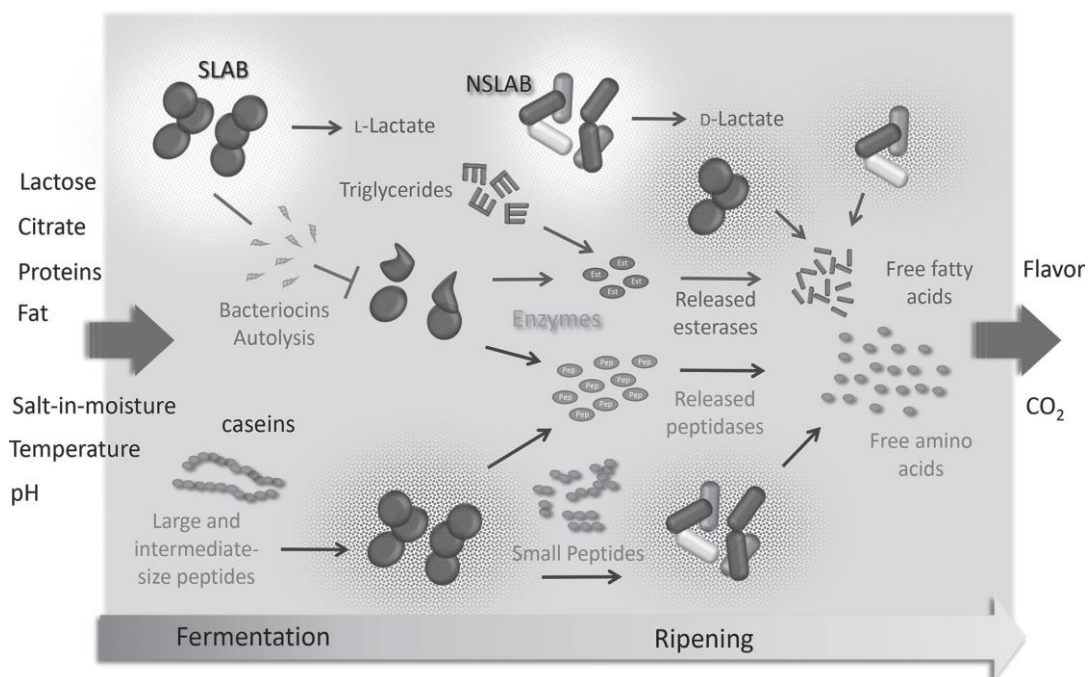


Figure 07: Représentation schématique des interactions entre les bactéries lactiques du type SLAB et NSLAB pendant la phase d'affinage du fromage (Blaya *et al.*, 2018).

La protéolyse constitue le phénomène majeur de l'affinage puisqu'elle améliore la texture, la digestibilité du caillé et la qualité organoleptique des fromages affinés (Urbach, 1995 ; Coker *et al.*, 2005 ; Widyastuti *et al.*, 2014). Les interactions entre les bactéries lactiques des ferments et les bactéries lactiques du type NSLAB lors du procédé de la fabrication des fromages sont à l'origine de l'évolution du coagulum pendant l'affinage (Blaya *et al.*, 2017).

De même, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites ayant une activité antimicrobienne, à l'égard des bactéries pathogènes et d'altération, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du CO₂, de la reutérine, du diacétyl et des bactériocines (Crow *et al.*, 2002 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes *et al.*, 2010 ; Settanni et Moschetti, 2010 ; Gatti *et al.*, 2014 ; Adjoudj *et al.*, 2020).

1.3.4.4.2. Biochimie de l'affinage

Elle peut être subdivisée en processus primaires et processus secondaires de dégradation. Le processus primaire comporte la fermentation du lactose résiduel, de l'acide lactique et de l'acide citrique, ainsi que la dégradation des protéines et des lipides. Suite à ces événements primaires, d'autres événements biochimiques secondaires prennent place et sont très importants sur le plan organoleptique, car ils permettent le développement des composés aromatiques provenant de catabolismes des acides aminés et des acides gras (Fox *et al.*, 1996 ; McSweeney, 2004 ; Wilkinson et Kilcawley, 2005). La figure 08 rassemble les principales réactions enzymatiques de l'affinage des fromages.

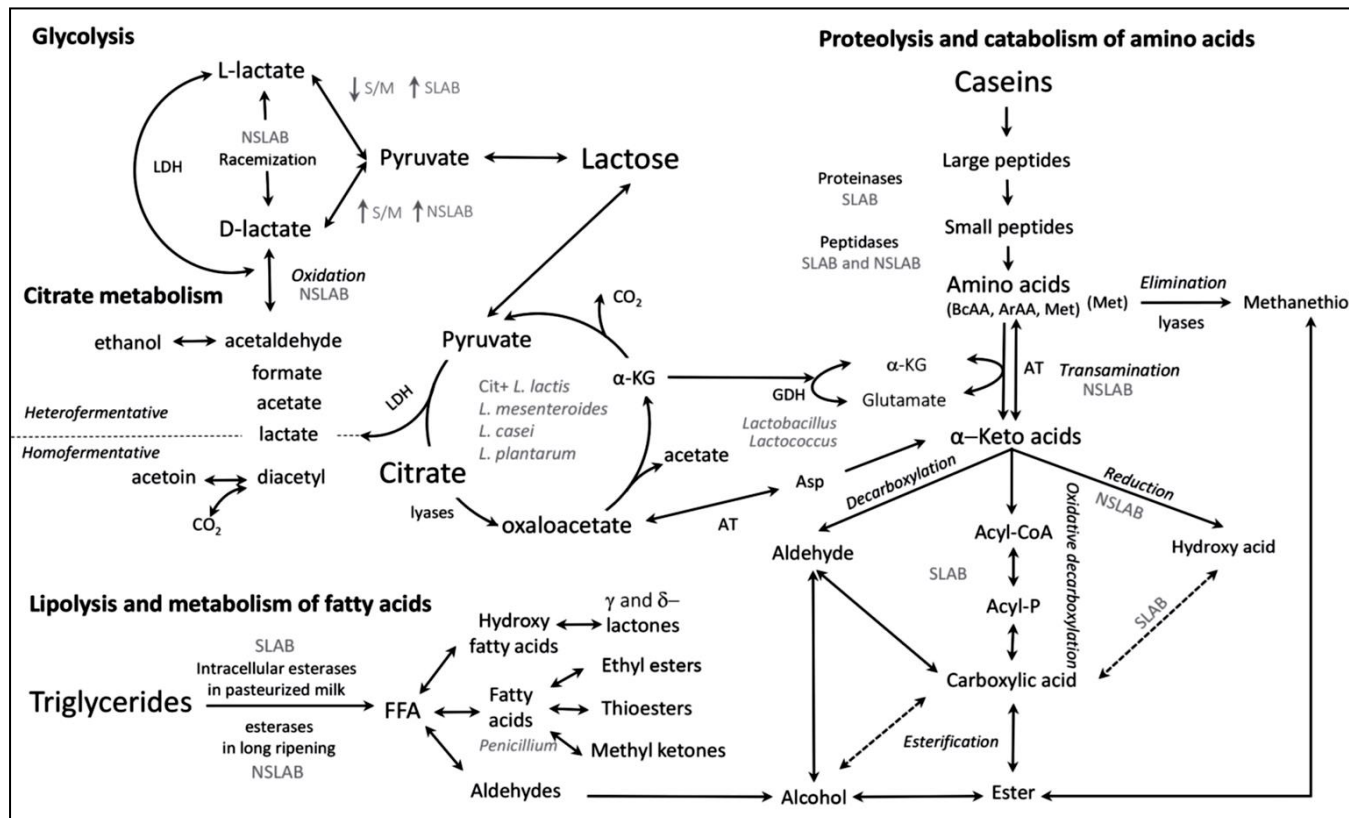


Figure 08: Mécanismes biochimiques de l'affinage des fromages (Blaya *et al.*, 2018).

1.3.4.4.2.1. Fermentation du lactose

L'acide lactique, produit de dégradation de la glycolyse, rentre dans de nombreuses voies métaboliques de l'affinage des fromages. Les bactéries des ferments et celles du type NSLAB, selon le rapport du sel/humidité, produisent à partir du lactose résiduel, du L-lactate et D-lactate, respectivement. L'acide lactique et le citrate subissent d'autres fermentations produisant l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide butyrique et le CO₂. Ces produits peuvent être transformés en composant de flaveur comme les aldéhydes et les cétones (Bresford *et al.*, 2001 ; Mc Sweeney, 2004 ; Murtaza *et al.*, 2014 ; McSweeney et Fox, 2017). Le citrate est métabolisé en diacétyl, acétoïne et en acide acétolactique (Cogan et Hill, 1993; De Figueroa *et al.*, 2000 ; De Figueroa *et al.*, 2001).

Au cours de l'affinage, la production de l'acide lactique permet à la flore fongique de coloniser la surface des fromages, entraînant la désacidification de la surface des fromages. Cette désacidification permet l'installation de la microflore de surface et la formation de divers composés volatils comme l'éthanol, l'acétaldéhyde, les aldéhydes et les cétones (Fleet, 1990 ; Mc Sweeney, 2004). L'acide lactique contribue à l'inhibition de la croissance de certaines espèces pathogènes et indésirables comme *Clostridium butyricum*, *Pseudomonas spp*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (El-Gazzar et Marth, 1992 ; Holzapf et *al.*, 1995 ; Ortolani *et al.*, 2010 ; Caro *et al.*, 2013 ; Yoon *et al.*, 2016).

1.3.4.4.2.2. Protéolyse

C'est le phénomène le plus complexe lors de l'affinage avec un degré de protéolyse qui varie en fonction des technologies et de la durée de maturation du caillé. La protéolyse contribue à la texture des pâtes, via l'hydrolyse enzymatique des CN du lait et aux goûts des fromages, par la libération de petits peptides et acides aminés qui sont transformés en précurseurs d'arômes (alcool, aldéhydes, acides, esters et les composés soufrés (Courroye, 1987 ; Urbach, 1995 ; Fox et Wallace 1997 ; McSweeney, 2004 ; Smit *et al.*, 2005 ; Widyastuti *et al.*, 2014).

Les ferments lactiques se caractérisent par un faible effet protéolytique en comparaison aux ferments d'affinage (*Penicillium requelfortii*, *camembertii*, *Brevibacterium linens*, *Propionibacterium spp*) dont *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum*, qui sont les agents les plus protéolytiques rencontrés à la surface des fromages, notamment dans le Camembert.

Les bactéries lactiques possèdent des protéases et peptidases qui définissent un système (protéinase/peptidase) complet, ce qui leur confère la capacité de dégrader les caséines en composés aromatiques (Atlan *et al.*, 2000 ; McSweeney et Sousa, 2000 ; Wouster *et al.*, 2002). Les protéases pariétales des bactéries assurent l'hydrolyse partielle de la caséine en polypeptides capables de traverser la paroi bactérienne et qui sont ensuite dégradés dans le cytoplasme bactérien par des peptidases cytoplasmiques (Desmazeaud, 1997).

La succession de la dégradation des CN en polypeptides puis en acides aminés varient selon les enzymes et la technologie fromagère. Le degré de protéolyse peut atteindre 35 % dans le Camembert au lait cru (Lenoir, 1963b ; Chamba, 2000).

1.3.4.4.2.3. Lipolyse

La lipolyse est un phénomène qui participe positivement à l'élaboration des qualités gustatives des fromages. Les enzymes lipolytiques dans les fromages proviennent du lait et des microorganismes. Le lait contient une lipase lipoprotéique (LPL) qui reste active dans les fromages au lait cru, alors que son activité est réduite par la pasteurisation. De plus, des microorganismes peuvent intervenir dans la lipolyse comme les moisissures et les microcoques. Les bactéries lactiques sont dotées d'endo-lipases qui s'activent dans le fromage après la lyse cellulaire (Alais et Linden, 1997 ; McSweeney et Sousa, 2000).

Les triglycérides (TGL) peuvent subir une dégradation enzymatique (lipolyse) ou chimique (oxydation) (Fox et Wallace, 1997 ; McSweeney et Sousa, 2000). L'hydrolyse enzymatique des TGL est réalisée par des estérases qui clivent les liaisons esters entre le glycérol et les acides gras (AG) à courte chaîne (C_2 à C_8) et par des lipases sur des TGL contenant plus longue chaîne ($>C_8$) (Collins *et al.*, 2003).

La plupart des acides gras libres (AGL) ayant un nombre de carbone entre 6 et 20 proviennent de la lipolyse des TGL, tandis que les AGL ayant un nombre de carbone entre 2 et 6 (acide acétique, acide propionique, etc.) proviennent généralement de la dégradation du lactose et des acides aminés (Molimard et Spinnler, 1996). Les AGL peuvent contribuer directement à la flaveur des fromages mais servent surtout de précurseurs pour la formation des composés volatils : les méthylcétones, les esters, les alcools secondaires et les lactones (Collins *et al.*, 2003 ; Bastian *et al.*, 2010).

Les AGL peuvent être oxydés en β -cétoacides puis décarboxylés en méthylcétones (Collins *et al.*, 2003 ; Kilcawley, 2017). Ces transformations biochimiques sont dues principalement aux moisissures qui sont trouvées dans les fromages à pâtes molles, à croûte fleurie et à croûte persillée (Curioni et Bosset, 2002 ; Bertuzzi *et al.*, 2018).

1.4. Camembert

Le Camembert est originaire de la région de Normandie, en France. Le célèbre fromage français « Camembert de Normandie » possède d'ailleurs une appellation d'origine contrôlée (AOC) signifiant que le lait utilisé ainsi que la fabrication, l'affinage et le conditionnement de l'aliment doivent être réalisés dans une région géographique précise et selon un cahier des charges défini (INAO, 2013). L'appellation « Camembert » n'est cependant pas protégée, ce qui fait que cette variété de fromage est produite partout dans le monde à partir de lait cru, thermisé ou pasteurisé (Spinnler et Gripon, 2004).

Le Camembert est un fromage à pâte molle, affiné en surface et possédant une croûte fleurie. La moisissure (*Penicillium camemberti*) et/ou la levure (*Geotrichum candidum*) colonisent majoritairement la surface du fromage, lui conférant son apparence spécifique (Leclercq-Perlat, 2000). Il se distingue des autres types de fromage par son arôme typique de champignon, son onctuosité et son feutrage blanc. Celui-ci étant en majeure partie dû à la présence dominante de *P. camemberti* (Leclercq-Perlat, 2000 ; Spinnler et Gripon, 2004).

Il est généralement composé de 18 à 30 % de matière grasse, de 50 à 55 % d'humidité et de 17 à 21 % de protéines (Sutherland, 2002). L'activité de l'eau (a_w) de ce fromage est élevée, soit environ 0,98 ce qui fait que sa durée de vie est relativement courte (Shaw, 1981, Sutherland, 2002), s'étalant jusqu'à 6 semaines pour un Camembert traditionnel (Poças et Pintado, 2009).

1.4.1. Fabrication et affinage du Camembert

Quatre éléments principaux interviennent dans la fabrication d'un fromage : le lait, l'enzyme coagulant (présure ou autre agent coagulant), la microflore microbienne et le sel (Beresford *et al.*, 2001). La fabrication du Camembert peut être fermière ou industrielle, avec des étapes de fabrications similaires, avec quelques différences dans les taux et les conduites opérationnelles, à l'exception du prétraitement industriel. Les étapes communes sont la coagulation, l'égouttage, le moulage, le salage et l'affinage (Figure 09).

1.4.1.1. Prétraitement du lait

Les qualités physicochimiques et microbiologiques du lait influent directement sur la qualité du fromage affiné. L'effet des facteurs tels la race, le stade physiologique, l'âge, le nombre de vêlage, l'alimentation et la saison ont été rapportés dans de nombreux travaux (Jarrige et Rossetti, 1957 ; Wood, 1969 ; Bocquier *et al.*, 1997 ; Sassi *et al.*, 2018).

Ainsi, il a été montré que les teneurs du lait en matières grasses et protéines évoluent de façon inversement proportionnelle à la quantité produite du lait. Le lait cru est plus riche en flore lactique durant le printemps et l'automne, alors que les flores, mésophile totale, coliforme fécaux et Streptocoques fécaux se trouveraient à des taux plus élevés au printemps.

L'effet des traitements technologiques du lait destiné à la fromagerie, comme la pasteurisation, la concentration et la microfiltration, ont un impact sur les enzymes natives (LPL et plasmine), enzymes exogène (d'origine animale ou microbienne) et la microflore du lait cru (Mas *et al.*, 2002 ; Benfeldt, 2006 ; Coghill *et al.*, 1982).

1.4.1.2. Production fermière

Selon la législation française (décret n°2007-628 du 27 avril 2007 révisé en 2019), la dénomination " fromage fermier " ou tout autre qualificatif laissant entendre une origine fermière est réservée à un fromage fabriqué selon les techniques traditionnelles par un producteur agricole ne traitant que les laits de sa propre exploitation sur le même lieu. Le lait est cru, il ne peut être traité thermiquement à plus de 40°C, ni être bactofugé, ultrafiltré, microfiltré ou subir un traitement d'effet équivalent. Le stockage du lait ne peut excéder 72 heures à compter de l'heure de la traite la plus ancienne jusqu'au début de la maturation.

Le lait mis en œuvre dans la fabrication du Camembert fermier est un lait de vache standardisé en matières grasses (3 à 3,5%) par écrémage d'une partie du lait, assemblé avec du lait entier ou par crémage naturel et cela suite à la remontée de la crème à la surface du lait (I.N.A.O, 2012). L'ajout des ferments lactiques sont interdits sauf exceptionnellement. Les seuls produits autorisés sont les ferments fongiques (*Penicillium camembertii* et *Geotrichum candidum*), CaCl₂ et la présure bovine, généralement de force coagulante de (1:10000).

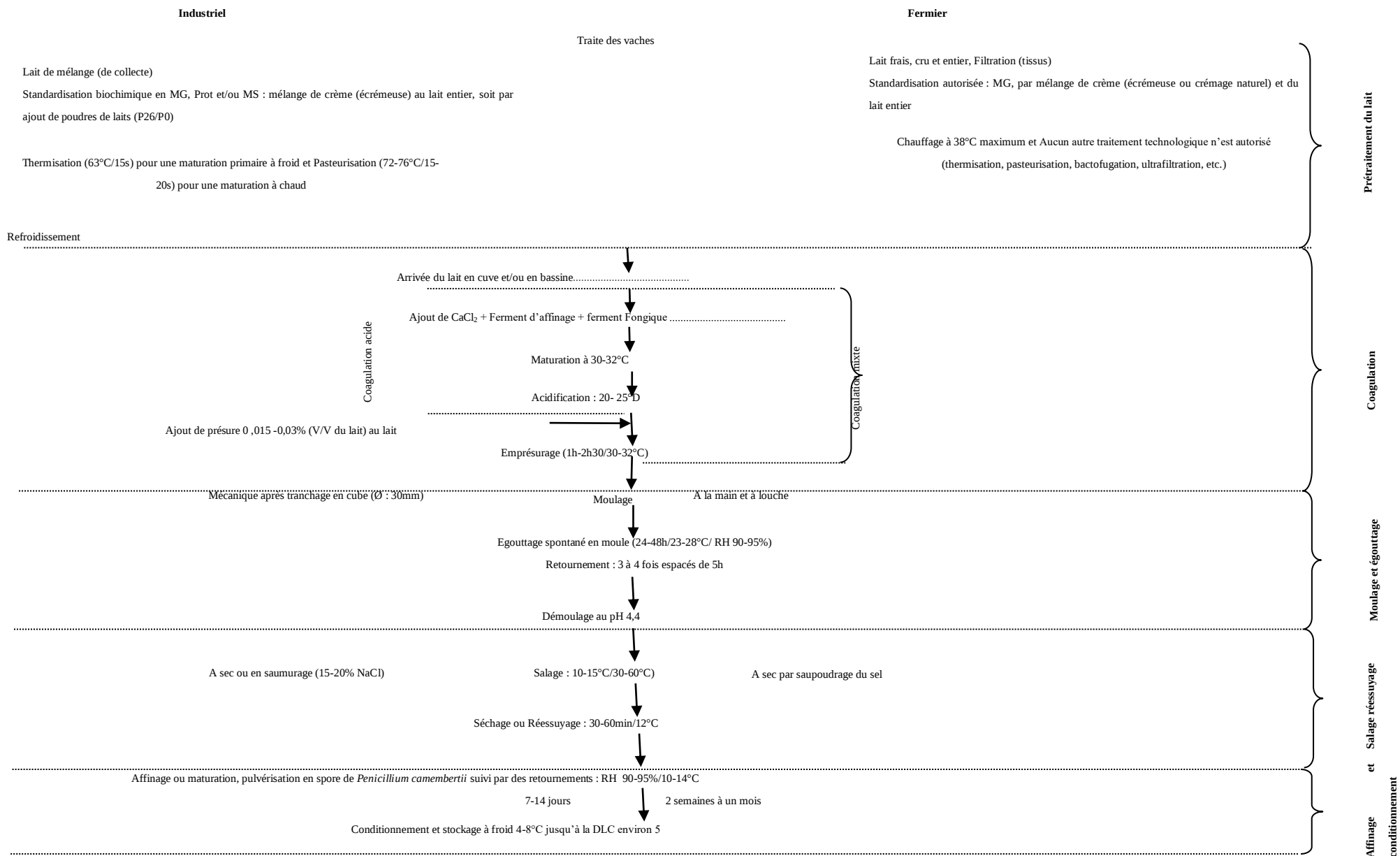


Figure 09 : Etapes de fabrication du Camembert fermier et industriel (Adaptée de Shaw, 1981 ; Galloway, 1995)

1.4.1.3. Production industrielle

Le lait de mélange provient de plusieurs éleveurs. Après la réception, le lait est stocké et réfrigéré à +4°C, au maximum 72h, sous agitation pour éviter la remontée des globules gras. En effet, il a été rapporté que lors du stockage réfrigéré, CN- β quitte la micelle pour s'en aller vers le sérum (Davies et Law, 1980 ; Walstra *et al.*, 1985).

1.4.1.3.1. Standardisation microbiologique

Les traitements technologiques (pasteurisation, thermisation, bactofugation, ultrafiltration) du lait de mélange sont nécessaires afin de réduire la flore globale, de détruire la flore pathogène et les enzymes natives du lait (LPL, Plasmine, etc.) et garantir une certaine qualité et homogénéité dans les fabrications (Mahaut *et al.*, 2000 ; Kongo, 2013). La composition des ferments lactiques utilisés est un mélange des espèces suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* et *Leuconstoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ; alors que la flore fongique est représentée par *Penicillium camembertii* et *Geotrichum candidum* (Khider et Albanna, 2017 ; Galli *et al.*, 2019).

1.4.1.3.2. Standardisation biochimique

Le lait de fromagerie est généralement standardisé à des taux de 3 et 3,5 % (M/V), respectivement pour les protéines et la matière grasse. Ce procédé peut être effectué soit par écrémage du lait entier, puis la crème est mélangée avec du lait entier ou écrémé, soit par ajout de poudres de laits au lait de mélange.

1.4.1.4. Maturation du Camembert

La maturation ou la coagulation acide dans le cas du Camembert (Fermier ou Industriel) peut être réalisée soit par une maturation en deux étapes (maturation à froid suivi d'une maturation à chaud), soit par une maturation en phase unique (maturation à chaud). La maturation à froid s'effectue à 10-14°C/15-20h, avec un taux d'inoculation en ferment de 0,1-0,2% avec ajout de CaCl₂ (0,05-0,2 g/L du lait). Tandis que la maturation à chaud, elle est réalisée à 30-32°C/20-60 min avec ajout des ferments fongiques (0,005-0,01%), des ferments lactiques (1,5-3%) et du CaCl₂ (6-20g/100 L lait).

1.4.1.5. emprésurage, moulage et démoulage

La prise du caillé débute environ un quart d'heure après l'addition de la présure. La durée totale du caillage est généralement comprise entre 1 et 2h.

Lorsque le caillé présente la consistance recherchée, l'opération de moulage du Camembert dans des moules en tôle d'acier étamé, ou en aluminium et parfois en plastique, démarre. Ils sont remplis soit à louche, manuellement pour le Camembert fermier (soit 4 à 5 louches à une heure d'intervalle) soit avec des pelles en plastique ou par des procédés mécanique (Camembert industriel).

Le premier retournement sera effectué lorsque le coagulum atteindra la moitié de la hauteur du moule après 6 à 7 h, pour poursuivre l'égouttage et aplanir la face supérieure du caillé. Le deuxième retournement est appliqué après 10 à 15h plus tard. Dans certains cas, l'égouttage et le retournement sont facilités par le dépôt, à la surface du caillé, d'une plaque métallique circulaire

d'environ 80g, dont la pression provoque une descente régulière du coagulum dans le moule, c'est l'opération de plaquage.

Le démoulage consiste à retirer les moules. La température de la salle doit être abaissée rapidement, jusqu'à 18 ou 20°C pour freiner l'égouttage ainsi que le développement de *Geotrichum candidum* qui entraverait l'installation de *Penicillium camemberti* sur la surface du Camembert.

1.4.1.6. Evolution physico-chimique et microbiologique

Les qualités organoleptiques du Camembert (artisanal ou industriel) ne sont que le résultat des modifications physico-chimiques (Glycolyse, protéolyse et lipolyse) et microbiologiques au cours de l'affinage. Les études ont rapporté que lors de la maturation du camembert, il se produit une désacidification de la pâte avec libération de l'ammoniac qui coïncide avec le développement de *P. camemberti* en surface. Ces modifications provoquent des changements physico-chimiques, avec un gradient de concentration entre la croûte et la masse du camembert, et qui s'accompagne de l'évaporation en surface des substances volatiles (H_2O , NH_3 , AGL, etc.) (Figure 10) (Baribo et Foster, 1952 ; Spinnler et Gripon 2004).

Globalement, cette transformation physico-chimique est l'œuvre d'un écosystème microbien qui est en perpétuelle évolution. Elle est caractérisée par une prédominance de la flore d'affinage (lactique et fongique) et la diminution de la flore indésirable (de contamination et de la flore pathogène) (Mourgues *et al.*, 1977 ; Gobbetti *et al.*, 1997 ; Arenas *et al.*, 2004).

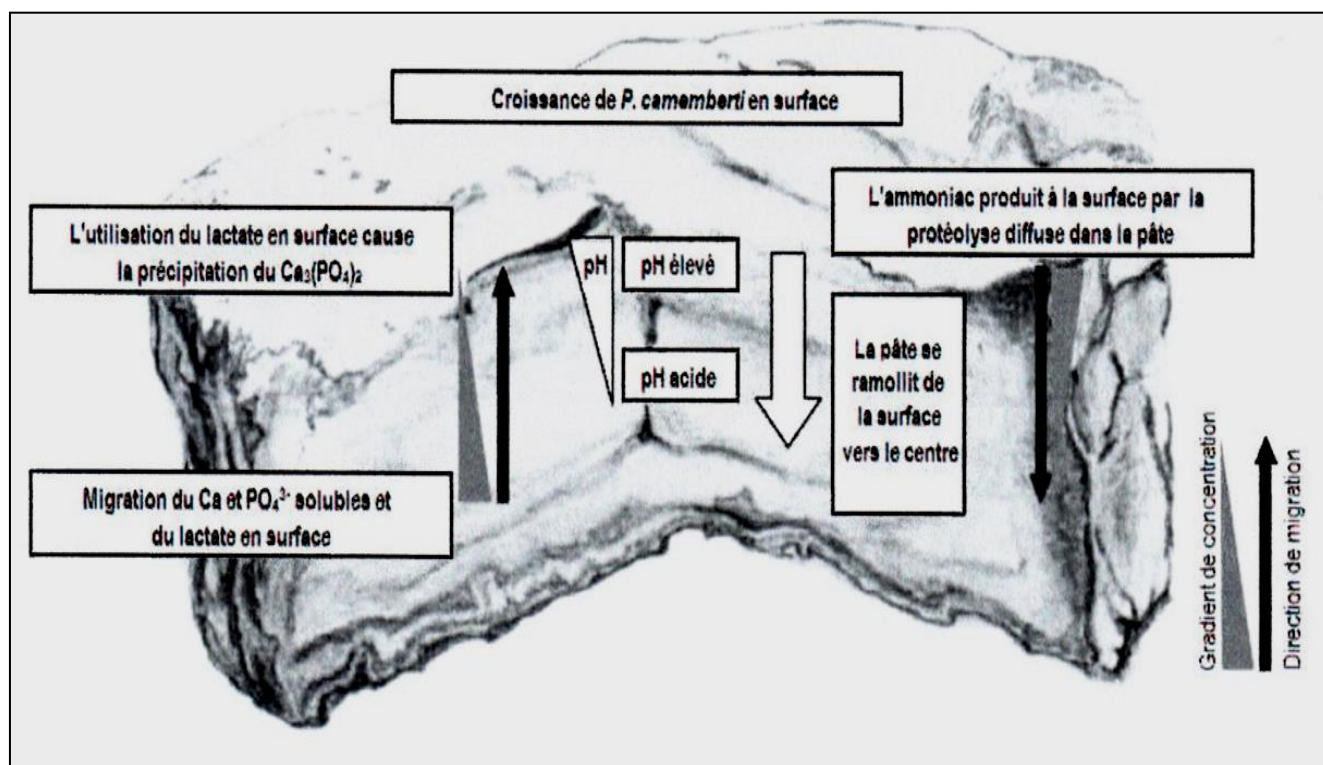


Figure 10: Changements physico-chimiques pendant l'affinage du Camembert (McSweeney, 2004)

1.5. Peptides bioactifs libérés lors de l'affinage

Les protéines du lait sont considérées comme une excellente source pour la plupart des peptides bioactifs. Ce sont des fragments de protéines, contenant généralement 2 à 20 résidus d'acides aminés qui peuvent être libérés suite à l'hydrolyse enzymatique du lait au cours de la digestion gastro-intestinale. La grande majorité de ces peptides sont libérés lors de la fermentation des produits laitiers et au cours de l'affinage des fromages. Ils ont un impact positif sur les fonctions de l'organisme (Corréa *et al.*, 2011 ; Power *et al.*, 2013 ; Bhat *et al.*, 2015 ; Mohanty *et al.*, 2016) (Figure 11).

Il a été montré qu'un certain nombre de ces peptides affectent les systèmes cardiovasculaire, neurologique, digestif, endocrinien et immunitaire tout en présentant des propriétés fonctionnelles telles que des activités antimicrobiennes, anti-thrombotiques, anti-hypertensives, anti-athérogènes, anti-oxydantes et immunomodulatrices (Korhonen, 2009 ; Barbé *et al.*, 2014 ; Lucey *et al.*, 2017 ; Rafiq *et al.*, 2020). Sur le tableau VI sont répertoriés quelques peptides bioactifs identifiés à partir des fromages.

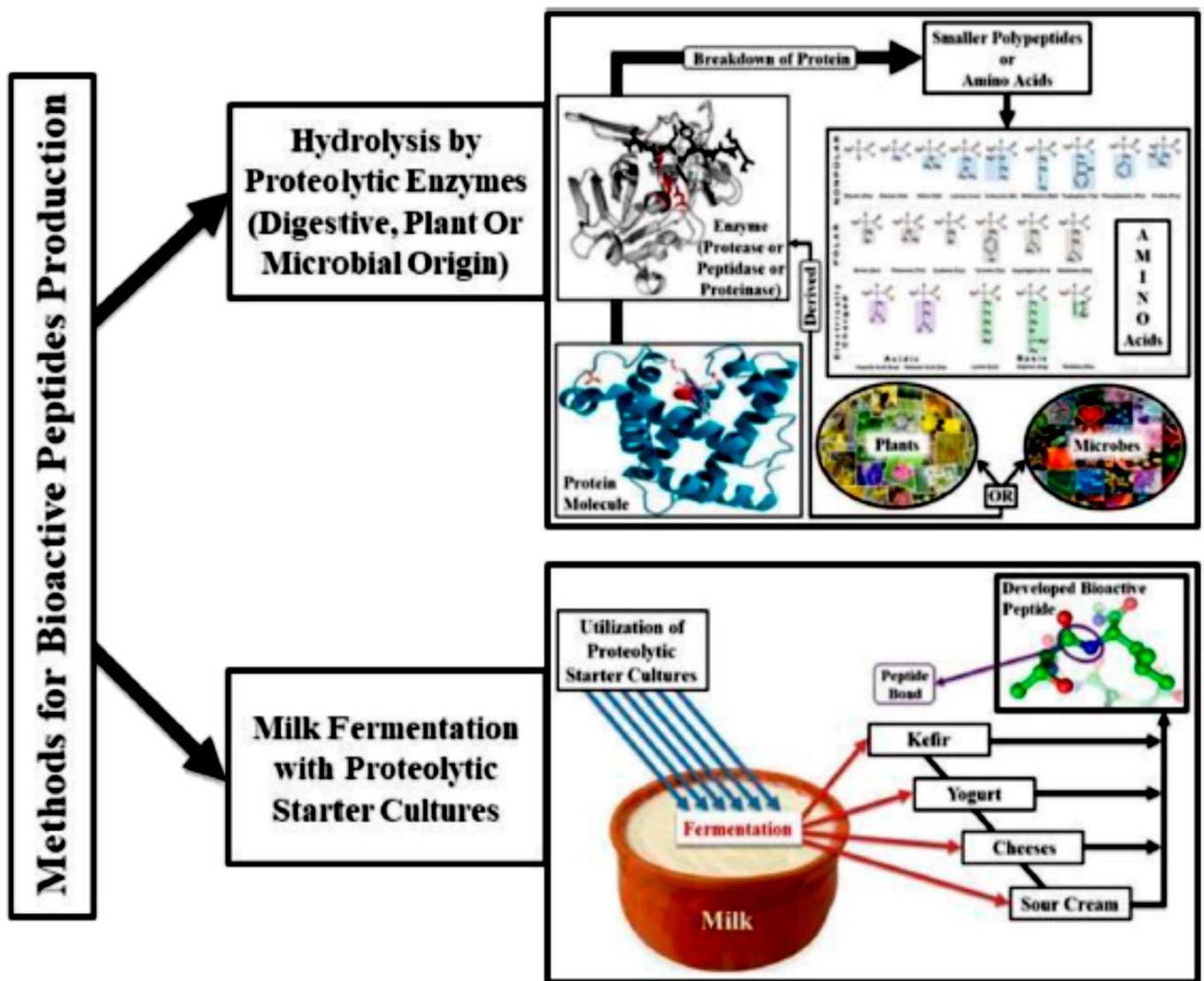


Figure 11: Représentation schématique des voies employées pour la production de peptides bioactifs (Dinika *et al.*, 2020).

Le type et la concentration de ces peptides dans les fromages peuvent varier en fonction du traitement thermique du lait, du type de la matière première utilisée, des conditions de fabrication, du stade de maturation et de la présure (Silva *et al.*, 2006 ; Sieber *et al.*, 2010 ; Meira *et al.*, 2012 ; López-Expósito *et al.*, 2017 ; Tagliazucchi *et al.*, 2019 ; Kocak *et al.*, 2020 ; Guha *et al.*, 2021).

1.5.1. Peptides à activité anti-oxydante

Le stress oxydatif est associé à une production excessive de radicaux libres, provoquant des dommages cellulaires et la modification de l'ADN (Evans *et al.*, 2003 ; Je *et al.*, 2007). Ces radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont à l'origine de maladies cardiovasculaires, d'athérosclérose, d'arthrite, de diabète et de cancers (Garcia-Nebot *et al.*, 2014). De plus, les ROS constituent des facteurs majeurs affectant la qualité des aliments, provoquant le rancissement, la toxicité et la dégradation des biomolécules (Heo *et al.*, 2005). Les ressources alimentaires contiennent des antioxydants naturels très demandés en raison de leur capacité à protéger contre les dommages oxydatifs et à retarder la peroxydation des lipides.

De nombreux peptides, qui proviennent principalement de la dégradation des caséines, sont libérés pendant la maturation des fromages. Il a été rapporté que l'activité anti-oxydante des fromages augmente pendant la période de maturation (Songisepp *et al.*, 2004). Les mécanismes antioxydants et la relation entre l'activité et la structure des peptides ne sont pas entièrement expliqués. Néanmoins, la propriété anti-oxydante d'un peptide est principalement liée à sa composition, sa structure et son hydrophobicité, ainsi qu'à la présence d'acides aminés particuliers et leur positionnement correct dans la séquence peptidique (Rajapakse *et al.*, 2005). En plus de la proline qui a montré une activité anti-oxydante (Gomez Ruiz *et al.*, 2004), Hernandez-Ledesma *et al.* (2005) ont trouvé que la tyrosine et le tryptophane possède aussi cette faculté.

En général, les propriétés anti-oxydantes des peptides sont liées à la présence de certains acides aminés hydrophobes (tryptophane, tyrosine...) et la présence de l'enchaînement Leu-Leu-Pro-His-His dans leur séquence peptidique (Kitts et Weiler, 2003).

1.5.2. Peptides à activité antimicrobienne

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont un groupe de molécules abondantes et diverses. Leur composition en acides aminés, leur amphiphile, leur charge et leur taille leur permettent de s'attacher et de s'insérer dans les bicouches membranaires (Brogden, 2005). Les peptides antimicrobiens identifiés dans les protéines laitières sont principalement issus des protéines suivantes : les Caséines, la β -Lactoglobuline, l' α -Lactalbumine et la Lactoferrine

Certains peptides contenus dans la séquence de ces protéines peuvent aussi avoir d'autres types d'activités biologiques comme les propriétés immuno-modulatrices, antioxydatives, anticancérigènes, anti-inflammatoires, propriété de chélation des minéraux ou d'augmentation de la satiété (Korhonen et Pihlanto, 2007 ; Benkerroum, 2010 ; Madureira *et al.*, 2010).

Tableau VI: Peptides bioactifs provenant de différents types de fromage
et de leurs effets fonctionnels *in vitro*.

Types de fromages	Séquences peptidiques identifiées	Activité bioactive	Références
Roquefort	β -CN f(211-220), f(122-132) α -S ₁ CN f(121-130)	Antioxydante Inhibition de l'ACE	Meira <i>et al.</i> (2012) Farvin <i>et al.</i> (2010)
Parmigiano Reggiano	β -CN f(98-105), f(78-91) α -S ₁ -CN f(1-23)	Antioxydante Antibactérienne	Martini <i>et al.</i> (2020), Sforza <i>et al.</i> (2012)
Burgos	α -S ₁ -CN f(180-199) β -CN (193-209), f (191-209)	Antioxydante	Timon <i>et al.</i> (2014)
Mozzarella, Gorgonzola	β -CN f(58-72)	Inhibition de l'ACE	Smacchi et Gobbetti 1998, Singh <i>et al.</i> (1997)
Gouda	α S ₁ -CN f(1-9), β -CN f(60-68),	Inhibition de l'ACE	Saito <i>et al.</i> (2000)
Cheddar	α S ₁ -CN : f(1-6), f(1-7), f(1-9), f(24-34), f(102-110) β -CN : f(47-52), f(193-209)	Inhibition de l'ACE	Ong <i>et al.</i> (2007) Ong et Shah (2008)
Minas	β -CN f(159-169)	Antibactérienne	Fialho <i>et al.</i> (2018)
Camembert	β -CN: f(25-25)	Inhibition de l'ACE Anti-carcinogène	Donkor <i>et al.</i> (2007) López-Expósito <i>et al.</i> (2016)
	β -CN : f(199-209), f(122-132), f(194-206), f(193-206), f(195-209)	Inhibition de l'ACE	Meisel et Schlimme(1994) ; Ha <i>et al.</i> , (2015) ; Miguel <i>et al.</i> (2006) ; Quirós <i>et al.</i> (2007) ; Villegas <i>et al.</i> (2014) ; López-Expósito <i>et al.</i> (2016); Liu et Pischetsrieder (2017)
	β -CN f(193-207)	Immun modulateur, Inhibition de l'ACE	Nongonierma et Fitzgerald(2016)
	β -CN f(57-72)	Opioide Inhibition de l'ACE	Jarmołowska <i>et al.</i> (1999) ; Quiróset <i>al.</i> (2007)
	β -CN f(193-209)	Antimicrobienne ACE	Birkemo <i>et al.</i> , 2009; Jin <i>et al.</i> (2016)
	α s ₁ -CN f(194-199)	Immunomodulatrice Inhibition de l'ACE	Shahidi et Zhong(2008)
	α s ₁ -CN f(1-23)	Immunomodulatrice Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> (2006); Martínez-Maqueda <i>et al.</i> (2013)

Les peptides antimicrobiens sont généralement constitués de 15 à 20 résidus d'acides aminés ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa et codés dans les séquences des précurseurs de protéines natives. Ils peuvent également être générés *in vitro* par hydrolyse enzymatique (Brogden, 2005 ; Tang *et al.*, 2008 ; Kim et Wijesekara, 2010). Ces peptides constituent une alternative prometteuse comme agents thérapeutiques contre divers microorganismes pathogènes (Cruz *et al.*, 2014). Quelques peptides antimicrobiens identifiés à partir des fromages sont rapportés dans le tableau VI.

Les AMPs issus des protéines du lait proviennent soit du groupe des AMPs cationiques, soit du groupe des AMPs anioniques (Tang *et al.*, 2008). Les AMPs cationiques sont caractérisés par une charge nette positive, une structure en hélice α et un caractère amphiphile, leur permettant d'interagir avec les phospholipides membranaires des bactéries et provoquer par la suite la mort cellulaire (Niidome *et al.*, 2005 ; Lopez-Expósito et Recio, 2006).

Les AMPs anioniques ont une charge nette négative, avec une faible activité antimicrobienne contre les bactéries Gram négatif. En effet, les charges négatives du LPS provoquent une répulsion électrostatique avec les AMPs anionique, lorsqu'ils tentent de s'attacher à la membrane des bactéries Gram négatif. À l'opposé, les bactéries Gram positif possèdent une couche protectrice de peptidoglycane, laquelle est composée de quelques molécules anioniques comme les acides teichoïques et lipoteichoïques. Cette composition pourrait faciliter l'attachement des peptides anioniques et conduire à la mort cellulaire de la bactérie Gram positif (Chen *et al.*, 2002).

1.5.2.1. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont un groupe hétérogène de bactéries qui fermentent le lactose en acide lactique comme principal produit du métabolisme. Les LAB sont classées dans les treize genres suivants : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oeococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les LAB produisent de multiples métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Des études ont montré que plusieurs souches de LAB ont la capacité de produire des bactériocines qui inhiberaient la croissance de bactéries altérantes et pathogènes dans les aliments (Buyong *et al.*, 1998; Cleveland *et al.*, 2001 ; Rodriguez *et al.*, 2005). Les bactériocines sont des agents de conservation naturels souvent utilisés dans le domaine alimentaire. Cependant, elles ont une activité antibactérienne restreinte aux bactéries Gram positif. La membrane externe des bactéries Gram négatif bloque le passage des bactériocines vers la membrane interne où se situe le site d'inhibition.

Parmi les peptides antimicrobiens commerciaux, la nisine est la plus utilisée dans l'industrie alimentaire comme agent de conservation naturel. Elle est la seule bactériocine reconnue par la World Health Organization comme étant sans danger en industrie alimentaire. Elle possède une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif, en particulier contre les pathogènes d'origine alimentaire comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus*.

Cette bactériocine montre une faible activité ou aucun effet antimicrobien contre les bactéries Gram négatif, les moisissures et les levures (Cao-Hoang *et al.*, 2010). La nisine est aussi un des seuls peptides antimicrobiens utilisés commercialement comme agent de conservation dans le

fromage transformé, les produits laitiers, le lait, les produits de viande et les légumes en conserve et elle est produite par certaines souches de *Lactococcus lacti* *ssubsp. lactis* (Thomas *et al.*, 1998).

La poudre de lacticine 3147 séchée par pulvérisation a une activité antimicrobienne efficace et peut être utilisée dans un certain nombre de produits alimentaires, tels que le yaourt et le fromage (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Plusieurs auteurs ont montré *in vitro*, que les bactéries lactiques isolées à partir du fromage artisanal inhibent, par production de bactériocines, les souches pathogènes les plus incriminées dans le fromage notamment *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* et *P. aurogenosa* (Diop *et al.*, 2007 ; Dal Bello *et al.*, 2010 ; Ortolaniet *al.*, 2010).

1.5.3. Peptides à activité hypertensive

Les peptides inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) pourraient présenter une activité anti-hypertensive (Yamamoto *et al.*, 1994 ; Nakamura *et al.*, 1995a ; Nakamura *et al.*, 1995b). L'ECA est une peptidyl-dipeptidase qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, et qui inactive la bradykinine qui a une action vasodilatatrice. Tout ceci a pour conséquence une augmentation de la pression artérielle. Des peptides inhibiteurs de l'ECA issus des caséines, les casokinines, sont générés par hydrolyse de la CN α s1, de la CN- β et de la CN- α s2 bovines (Maruyama et Suzuki, 1982 ; Maruyama *et al.*, 1987; Meisel et Schlimme, 1994 ; Tausin *et al.*, 2002).

De nombreux peptides inhibiteurs de l'ECA sont isolés de la caséine (Otte *et al.*, 2007), du lait fermenté (Chen *et al.*, 2007) et différentes variétés de fromages (Ryhanen *et al.*, 2001 ; Tonouchi *et al.*, 2008 ; Rafiq *et al.*, 2017). Les peptides inhibiteurs de l'ECA sont principalement à chaîne courte contenant des acides aminés hydrophobes en position C-terminale, des résidus de proline, de lysine ou d'arginine (Murray et FitzGerald, 2007).

1.5.4. Autres peptides bioactifs

Plusieurs autres effets physiologiques ont été décrits pour les peptides bioactifs libérés lors de la maturation des fromages tels qu'une activité anti-inflammatoire et opioïde.

Les peptides immuno-modulateurs ont la capacité de réguler la réponse immunitaire par différents mécanismes. Plusieurs peptides bioactifs libérés lors de l'affinage des fromages ont cette propriété. Gagnaire *et al.* (2001) ont isolés deux fragments immuno-modulateurs à partir de la caséine β et α lors de la maturation du fromage Emmental.

Les peptides opioïdes agissent comme des régulateurs des systèmes nerveux central et périphérique. Ils peuvent avoir des effets agonistes ou antagonistes. Par leurs actions sur les hormones digestives, ces peptides pourraient être utiles à la régulation de l'appétit et au contrôle du poids. Le fragment peptidique YFPF correspondant au β -CN f(60-63) bovin a été isolé à partir du cheddar australien et a été classé comme peptide agoniste opioïde (Dionysius *et al.*, 2000).

Matériel et Méthodes

II-Matériel et méthodes

Les analyses opérées dans le cadre de cette étude ont été réalisées au Laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Elles ont été sous tendues par les moyens d'investigation listés ci-après.

2.1. Matériel

2.1.1. Appareillage

- Lacto-scan SP (Milkotronic LDT, Bulgarie) ;
- Incubateur Delvotest SP-NT (Mini 25 ampoules, DSM, Hollande) ;
- Lyophilisateur à plateaux (TelestarLyoQuest) ;
- Dessiccateur infrarouge (IR 35, Denveur instrument) ;
- Butyromètre Van-Gulik (Funkgerber Instrument, Germany);
- Spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu) ;
- Centrifugeuse réfrigérée (LABOFUGE);
- pH mètre (Hanna-instrument, Italie) ;
- Balance de précision à 0,01 mg (Sartorius) et balances analytiques à affichage digital (0,01g) (Denver Instrument) ;
- Bain Marie (Memmert, Allemagne) ;
- Unité d'électrophorèse sur mini-cuves verticales (Hoeffer SE 260, USA) avec cuves d'électrophorèse, générateur de courant (max : 250V et 100 mA), plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm), espaceurs d'épaisseurs variées (0,75 ; 1 ; 1,5 mm) ;
- Unité de chromatographie haute performance en phase inverse (RP-HPLC) avec une colonne analytique Lichrosorb C8 (caractéristiques : 125 x 4,6 mm, 5 µm taille de particules, porosité), équipée d'un détecteur UV-Visible et d'un détecteur à réfractométrie.

2.1.2. Kits de diagnostics et matériel biologique

- Galerie API 20 ;
- Kit d'étalonnage en électrophorèse PAGE-SDS (Mm allant de 14 à 67 kDa) ;
 - Présure liquide de force coagulante 1 :10000 (Présure de veau Halal. Hansen Inc., Danemark) ;
 - Sérum albumine bovine (BSA), (SIGMA ; USA) pour le dosage des protéines ;
 - Présure en poudre de force coagulante 1 :150000 (Marzym, Danisco, France) ;
 - Ferments lactiques mésophiles (DI-PROX M229, BioProx, France) ;
 - Ferments lactiques thermophiles (DI-PROX TPM2, BioProx, France) ;
 - Ferments fongiques constitué de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* (Chr, Hansen, Inc., Danemark) ;
 - Micro-organismes pour les tests d'activités anti-microbiennes (*Escherichi coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ;
 - Catalase (SIGMA ; USA).

2.1.3. Produits et réactifs spécifiques

Acrylamide, N, N'- méthylène - bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, Dodécyl sulfate de sodium (SDS), N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine (TEMED), acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic (TNBS) , réactif de Folin-Ciocalteu, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), Ferrocyanure de potassium, réactif de Raïdex- CMT (Teepol de sodium), citrate de sodium.

2.2. Méthodes

2.2.1 Échantillonnage

Les échantillons de lait utilisés pour la production de Camemberts proviennent de vaches laitières, à prédominance de races Holstein et Montbéliard, d'un âge moyen de 4 à 8 ans, et prises au même stade de lactation. La période d'affinage est fixée à 12 jours, en référence aux pratiques industrielles algériennes. Deux types de Camemberts, l'un artisanal et l'autre industriel, sont produits dans deux sites de la wilaya de Tizi-Ouzou (Figure 12).

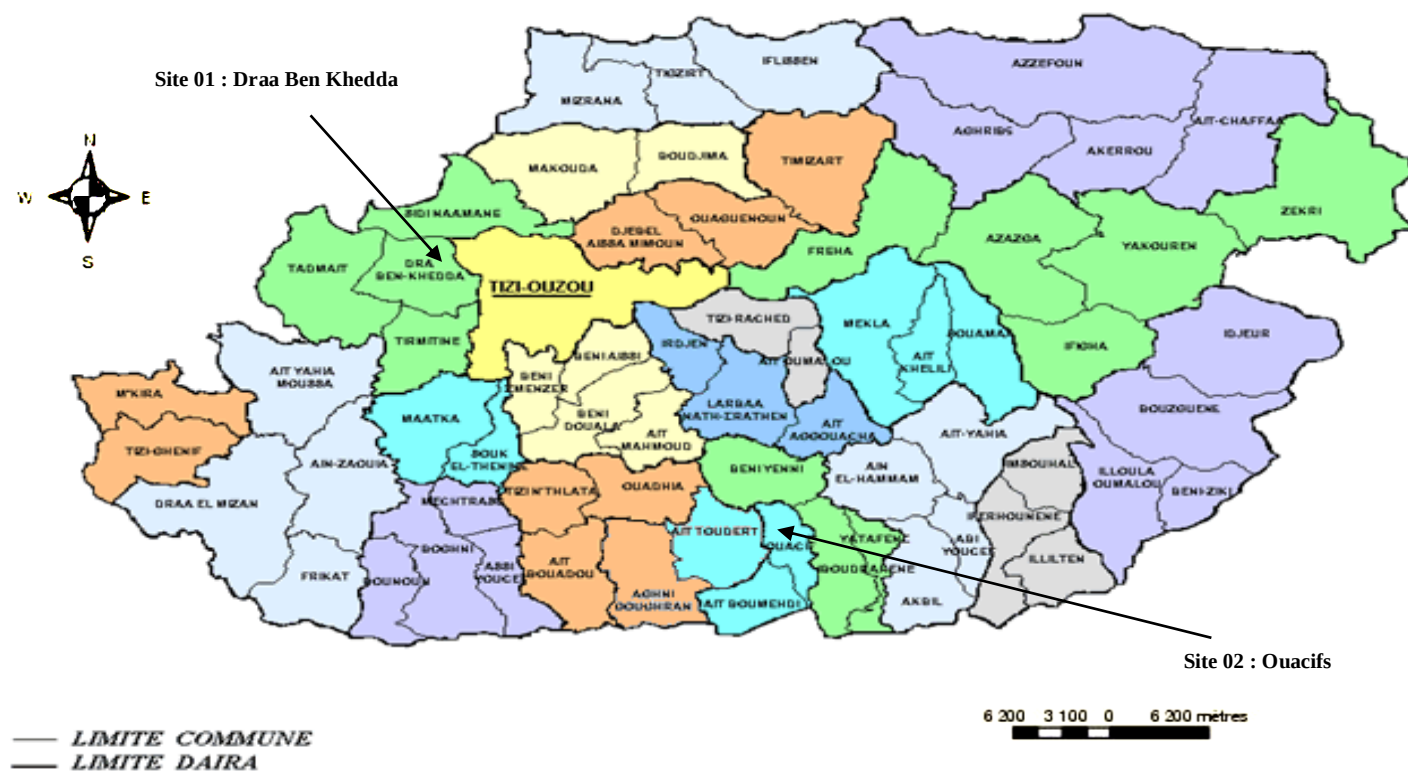


Figure 12: Sites d'échantillonnage et de production des fromages

Les analyses ont été effectuées sur 108 échantillons de chaque type de Camembert et sur 27 échantillons de chaque type de lait (cru et pasteurisé). Afin d'éviter l'effet de la saison sur la composition physico-chimique et microbiologique du lait, les campagnes d'échantillonnage annuelles (2014-2016) se sont étalées sur les mois de mars à juin. Trois échantillons par mois sont prélevés pour chaque cas : laits (cru / pasteurisé) et fromages correspondant aux stades de maturation suivants: premier, quatrième, sixième et douzième jour d'affinage (Tableau VII). Placés dans une glacière, les échantillons ont été directement acheminés au laboratoire et les analyses ont été effectuées dans les 24 à 48 heures qui suivent l'échantillonnage.

Tableau VII: Répartition des échantillons selon le type du lait et le stade d'affinage

Echantillons	Stades d'affinage	Plan d'échantillonnage									Total d'échantillon Par stade d'affinage
		1 ^{ère} année			2 ^{ème} année			3 ^{ème} année			
		1 ^{er} mois	2 ^{ème} mois	3 ^{ème} mois	1 ^{er} mois	2 ^{ème} mois	3 ^{ème} mois	1 ^{er} mois	2 ^{ème} mois	3 ^{ème} mois	
Camembertsartisanal ouindustriel	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	12	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	Total d'échantillons de Camemberts à tous les stades d'affinage										108
Laitcru ou pasteurisé	Échantillon mensuel	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Total des échantillons de laits= 27

2.2.2. Fabrication des fromages type Camembert

Les diagrammes de fabrication suivis dans ce travail, répondent globalement aux spécifications technologiques du Camembert. Le moulage des fromages (CA et CI) a été effectué dans des moules perforés en polyuréthane (cylindres de 10 à 11 cm de diamètre et de 13 à 14 cm de hauteur). Le démoulage est effectué lorsque l'acidité lactique du caillé atteint des valeurs de 9,5 à 11 % (p/p) et un pH de 4,5 à 4,9.

2.2.2.1. Camembert artisanal (CA)

Il est fabriqué à partir de lait cru dans la localité de Ouacif (Tizi-Ouzou, Algérie) par un éleveur-fromager qui élève des bovins laitiers en élevage extensif et transforme le lait de son propre troupeau en Camembert, selon les orientations de la législation française relative aux fromages et spécialités fromagères (art. 9 et 14 du décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013).

Le lait est chauffé à 35°C jusqu'à atteindre une acidité de 22 à 25°D, avant qu'une présure liquide (force coagulante de 1:10000, présure de veau Halal, Chr. Hansen Inc., Danemark) ne soit ajoutée (15-20 ml/100 L de lait).

Après coagulation (1h10 min-1h30 min), le moulage du fromage est effectué directement à la louche dans des moules perforés en polyuréthane, sans remuer le caillé, à raison de 5 louches par moule, avec une période de repos de 15 à 20 minutes entre chaque louche.

L'égouttage est fait sur des claies en acier inoxydable (24 à 48 h, 25-28°C, HR de 95%), en retournant le fromage toutes les cinq heures. Le salage est effectué par saupoudrage de sel fin. Ensuite, le fromage (CA) est aspergé d'une solution de spores de *Penicillium camemberti* (2x10⁴ spores/ml). L'affinage est fixé à 12 jours à une température de 10 à 12°C et à une humidité relative (HR) de 90 à 95 %, avec une rotation tous les deux ou trois jours.

2.2.2.2. Camembert industriel (CI)

Il est fabriqué à partir de lait pasteurisé dans une fromagerie industrielle située à Draa Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Cette dernière s'approvisionne en lait à partir de son propre centre de collecte situé au niveau de la région de Freha (Tizi-Ouzou). Sans subir de standardisation (ni en matière grasse, ni en protéines), le lait est pasteurisé à 90°C pendant 20 secondes, puis refroidi aussitôt à 36°C. Après avoir ajouté du CaCl₂ (15-20 g/100 L de laits), le lait estensemencé à des taux de 2 à 3% en ferments lactiques (Mésophile : DI-PROX M 229, BioProx, France. Thermophile : DI-PROX TPM 2, BioProx, France). Il est additionné en outre de 0,03 % d'une solution fongique (Chr. Hansen Inc., Danemark) constituée de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum*, afin d'atteindre les concentrations finales respectives de 10² spores/ml et 2x10⁴ spores/ml. Après 20-25 min de fermentation (pH 6,35), la présure en poudre (force coagulante de : 150000, Danisco. France) est ajoutée à raison de 1,5 g/50 Kg de lait.

Après la phase de coagulation, le caillé est divisé en petits cubes (Ø = 30 mm). Pour accélérer l'égouttage. Le coagulum est remué deux fois pendant 15 minutes avec un intervalle de cinq minutes. Le lactosérum est évacué par pompage, puis le moulage est réalisé par remplissage mécanique des moules.

Le coagulum est drainé par la suite dans des moules en polyuréthane placés sur des drains en acier inoxydable pendant 15 à 20 heures à une humidité relative de 90 à 95% (27°C- 5 h et 20°C-15 h), avec des rotations toutes les cinq heures. Après avoir été démoulé, le fromage est salé par saumurage (NaCl 40%, pH = 4,5) pendant 30 à 60 minutes à 13°C. La surface du fromage est séchée dans la salle de ressuyage pendant 15 heures (14°C, RH = 85 %) avec deux retournements. Après avoir été pulvérisé d'une suspension de spores de *Penicillium camemberti* (2.10⁹ Spores/ mL) (Chr. Hansen Inc., Danemark), le fromage est affiné pendant 12 jours (12-13°C, RH = 90-95 %) avec des retournements chaque deux à trois jours.

2.2.3. Analyses physico-chimiques du lait

2.2.3.1. Densité, teneurs en matière grasse (MG) et en protéines

Ces paramètres sont déterminés à l'aide d'un Lacto-scan SP (Milkptronic LDT, Bulgarie) calibré pour le lait de vache. Son principe de fonctionnement repose sur la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), considérée comme la méthode la plus appropriée (au niveau de sa précision, sa fiabilité et sa reproductibilité) pour l'analyse en routine du lait. En fait, cet appareil automatique exploite à bon escient les premiers résultats concluants obtenus par Goulden en 1964, qui a décrit une méthode permettant d'effectuer le dosage des matières grasses, des protéines et du lactose dans le lait par spectrophotométrie infra-rouge (I.R.). Le spectre obtenu a montré un premier pic d'absorption à 573 nm, caractéristique du groupe carbonyle (-C = O-) des liaisons ester des triglycérides, un deuxième pic à 646 nm, caractéristique de la liaison amide (- CONH -) des protéines et, enfin, une zone d'absorption à 960 nm, correspondant aux groupements hydroxyle (- OH) du lactose.

2.2.3.2. pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Hanna-instrument, Italie), à la température de mesure par trempage dans un volume de 10 mL du lait. Préalablement le pH mètre est

étalonné, en utilisant la gamme de pH appropriée de solutions étalons (pH=4, pH=7 ou pH=9) conservées à basse température au réfrigérateur.

2.2.3.3. Acidité titrable

L'acidité titrable est mesurée par titrage avec une solution de NaOH (1/9 N) en présence d'un indicateur de coloration (phénolphthaléine, 0,1 %). Elle est exprimée en degré Dornic (°D) (AFNOR, 1980).

2.2.3.4. Teneur en matière sèche

La teneur en matières sèches est déterminée par la méthode décrite par AFNOR (1980), par utilisation d'un dessiccateur infrarouge IR35 (Denver instrument, Germany), en évaporant 3 g de lait pendant 20 min. le teneur en matières sèches est exprimée en pourcentage.

2.2.3.5. Recherche d'antibiotiques

La recherche d'antibiotique est effectuée par le Delvotest. SP-NT (Mini 25 ampoules, DSM, Hollande). Celui-ci se présente sous forme d'ampoules (Figure 13) contenant un milieu gélosé ensemencé par *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, qui est particulièrement sensible vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines et des sulfamides (Abidi, 2004 ; Romnee, 2009).

Ce test combine le principe de la diffusion en gélose avec le changement de couleur de l'indicateur (pourpre de bromocrésol), suite à la croissance de *Bacillus*. C'est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de détecter les résidus d'antibiotiques dans le lait.

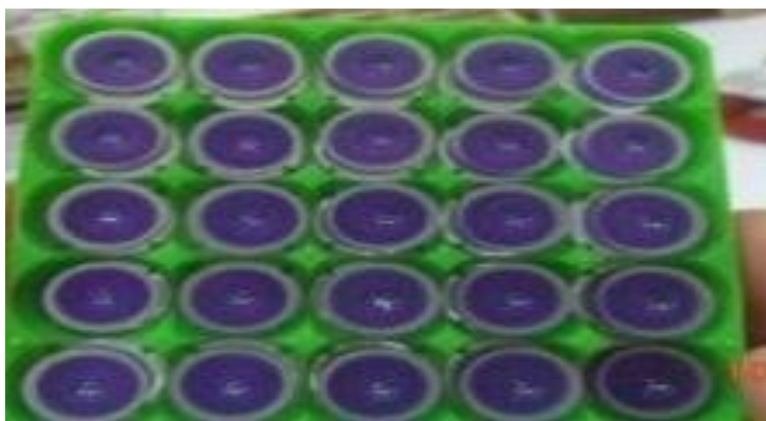


Figure 13 : Delvotest ® -SP-NT 25 ampoules

Afin de détruire les inhibiteurs (lysozyme et lactoferrine, etc.) naturellement présents dans le lait, 10 mL de chaque échantillon de lait (cru/pasteurisé) sont chauffés à 80°C pendant 10 min dans un autoclave. Après ce traitement, 100 µL de lait (cru/pasteurisé) sont prélevés à l'aide d'une pipette puis décantés lentement dans les ampoules Delvotest SP-NT identifiées au préalable pour chaque échantillon à tester. Finalement, les ampoules sont incubées dans le Delvotest (figure 14) à 64°C ± 1°C pendant 3h.

Si le lait ne contient aucune substance inhibitrice, l'indicateur de pH vire du violet au jaune, en raison de la production d'acide par le germe. Mais en présence de substances inhibitrices, la couleur

du milieu gélosé reste pourpre (violet), car ces dernières empêchent la croissance du germe et par conséquent la production d'acide lactique. Les résultats sont déterminés en se référant à la nuance de couleur, selon les instructions de la firme de production (Figure15).



Figure 14: Incubateur Delvotest SP-NT

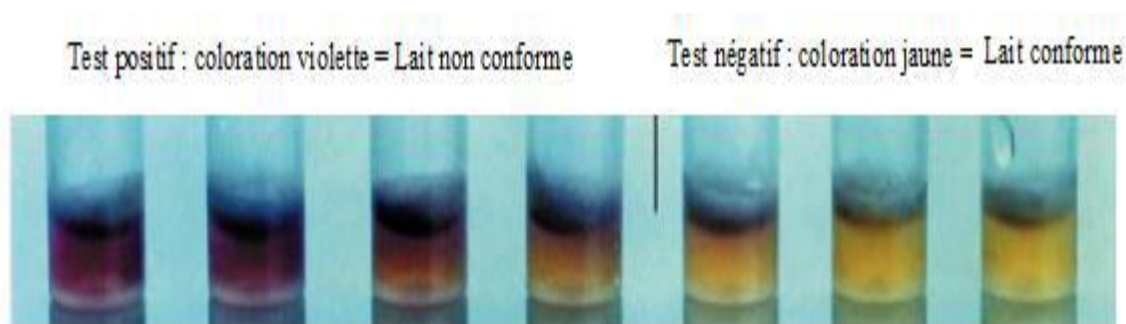


Figure 15: Interprétation des résultats du Delvotest SP-NT

2.2.4. Analyses physico-chimiques du fromage

2.2.4.1. pH

Il est mesuré en introduisant une électrode du pH-mètre (Hanna-instrument, Italie) dans un bécher contenant du fromage râpé et tassé, après avoir enlevé la croûte (Bouton *et al.*, 1994).

2.2.4.2. Acidité titrable

L'acidité titrable est mesurée selon la méthode décrite par Sulieman *et al.* (2012). 5 g de Camembert sont homogénéisés avec 40 mL d'eau distillée à 40°C dans un mortier. Le volume de la solution fromagère est ajusté à 100 mL. La solution est titrée par NaOH (0,1 N), en présence de phénolphthaléine (0,1 %). L'acidité du fromage est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité titrable}(\%) = \frac{V_{\text{NaOH}} \times 0,1 \times 90,08 \times 100}{P \times 1000}$$

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour la titration (mL);

90.08 : Masse molaire acide lactique (g/mol);

T : Volume totale solution fromagère (mL);

PE : Prise d'essai fromage (5 g).

2.2.4.3. Extrait sec total (EST)

En se basant sur le principe de la méthode décrite par Randoin et Jourdan (1952), l'EST est déterminé avec un dessiccateur infrarouge IR35 à partir de 5g de fromage (écrouté et broyé).

2.2.4.4. Matière grasse

Elle est déterminée à partir de 3g de fromage (écrouté et broyé) à l'aide du butyromètre Van-Gulik (Funkgerber Instrument, Germany), selon les indications décrites pour la norme algérienne (JORADP, 2014).

2.2.4.5. Teneurs en protéines totales, protéines solubles et azote non protéique

La détermination de la teneur en protéines est réalisée par un dosage colorimétrique selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Il s'agit d'une évaluation basée sur deux réactions simultanées : une réaction de Biuret par laquelle les protéines donnent en milieu alcalin un complexe cuivrique coloré et une réaction où les noyaux phénoliques de la tyrosine et du tryptophane et, à un degré moindre la cystéine et l'histidine, réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration développée, proportionnelle à la concentration en protéines, est mesurée à 750 nm. La teneur en protéines des échantillons analysés est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'Albumine Sérique Bovine (BSA) comme protéine étalon (Figure 16).

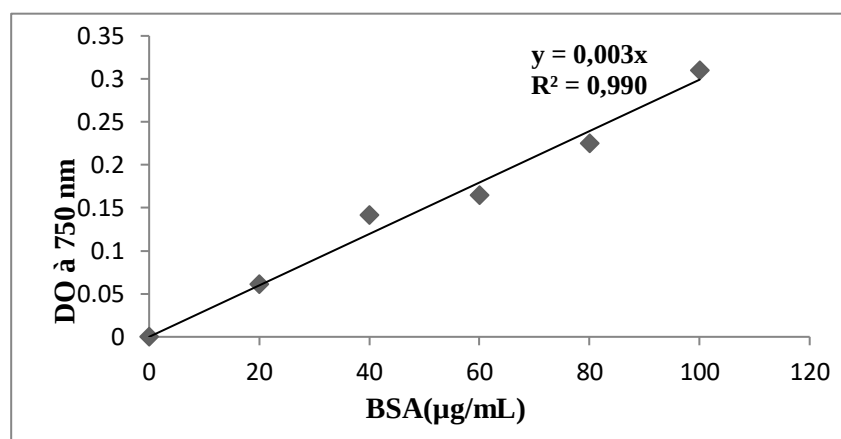


Figure 16: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

Les différentes fractions protéiques sont obtenues en combinant, avec quelques modifications, les méthodes décrites par certains auteurs (Manolkidis *et al.*, 1970 ; Gripon *et al.*, 1975 ; Guerra-Martinez *et al.*, 2012).

2.2.4.5.1. Protéines totales

Les protéines totales sont déterminées à partir de la solution fromagère. Cette dernière est obtenue par la dissolution totale de 20g de fromage (écrouté et broyé) dans 40 mL de tampon de citrate de sodium (0,5 M, pH 7). Le volume de cette solution est ajusté à 100 mL avec un tampon citrate puis chauffée à 40°C/1 h (figure 17). La teneur en protéines totales (PT%) est exprimée en gramme de protéines /100 grammes de fromage.

2.2.4.5.2. Protéines solubles

Un volume de 50 mL de la solution fromagère écrémée, est acidifié sous agitation douce avec du HCl (1 N) jusqu'à pH 4,6 puis incubé à 25 °C/20 min. Pour éliminer le reste de matière grasse, le mélange est centrifugé (6000 g/30 min/4 °C). Le surnageant est filtré (filtre Wathman n°42). Une partie du filtrat limpide est dosée par la méthode de Lowry *et al.*, (1951) et représente la fraction de protéine soluble (PS), exprimée en % PS (g/100g protéines totales).

2.2.4.5.3. Azote non protéique

15 mL d'eau distillée et 10 ml de solution d'acide trichloracétique (TCA) à 60 % sont ajoutés à 25 ml de la solution utilisée pour le dosage de protéines sériques. Le mélange est incubé pendant 20 min à 25°C puis centrifugé (6000g/15 min/4°C). Le filtrat est utilisé pour la détermination de la fraction Azotée Non Protéique (ANP), exprimée en % ANP (g/100g de protéines totales).

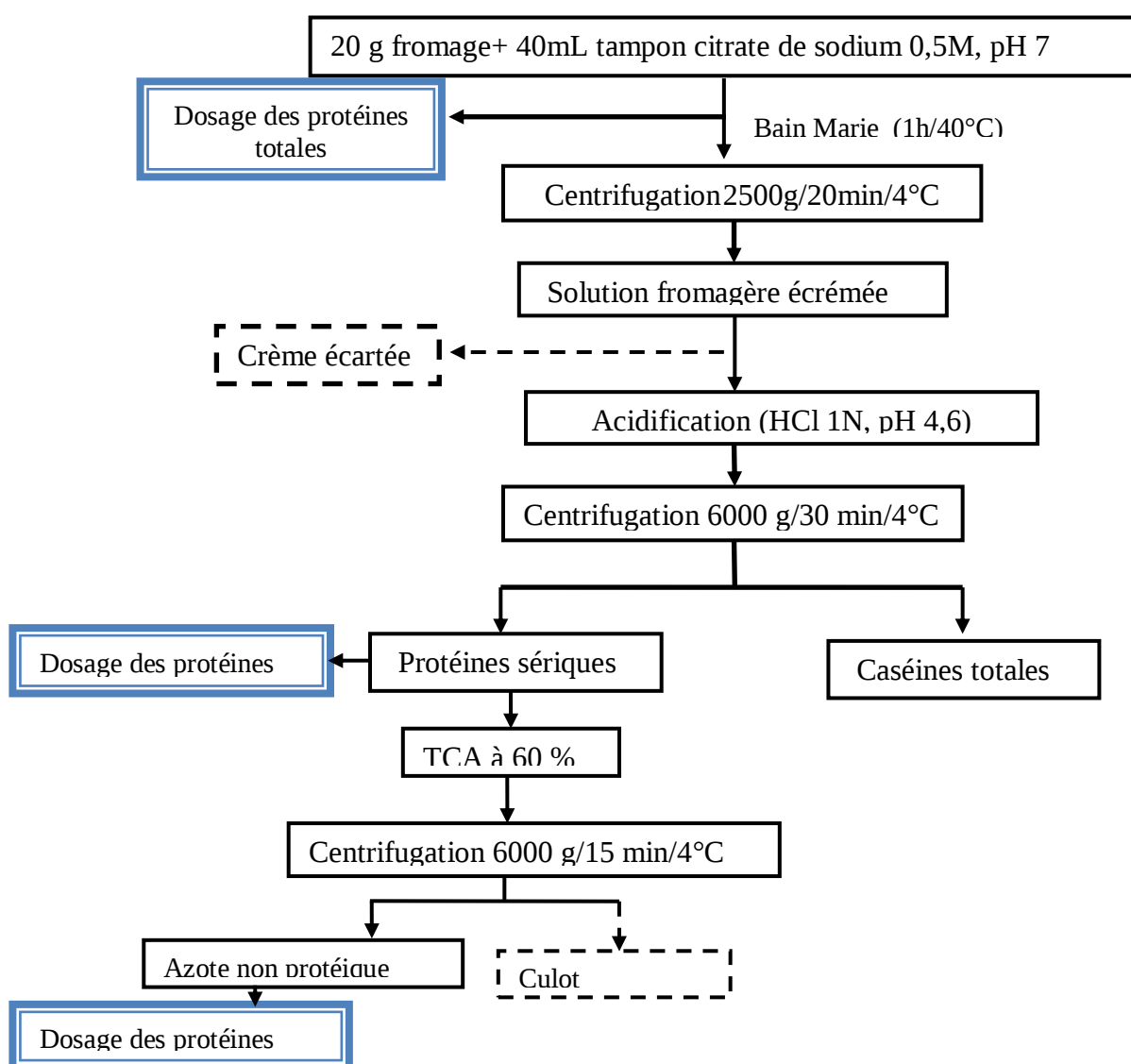


Figure 17: Protocole de fractionnement des protéines à partir des fromages type Camembert fabriqués (artisanal / industriel).

2.2.5. Suivi de la protéolyse

2.2.5.1. Dosage des groupements α -aminés par l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) :

Cette technique est basée sur le dosage à 420 nm du complexe trinitrophénylé formé (jaune) entre l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique et les groupements α -aminés libres des acides aminés (Figure 18), des peptides ou des protéines. Cette méthode est rapide et peu coûteuse.

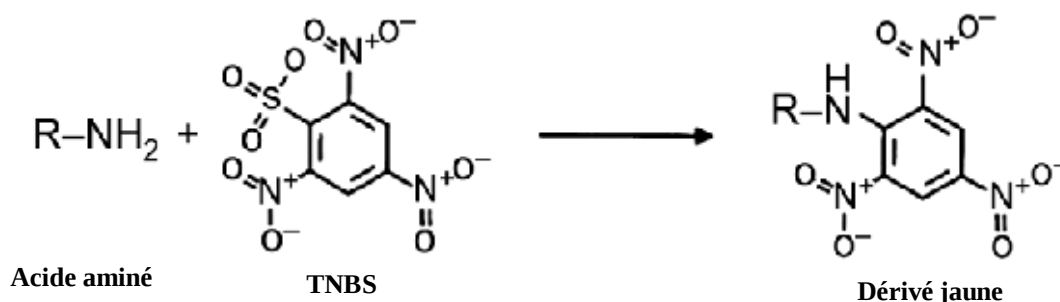


Figure 18: Réaction de l'acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) avec un acide aminé.

Le dosage des acides aminés libres par le TNBS au cours de l'affinage est réalisé par le protocole décrit par Polychroniadou (1988) modifiée par Bouton *et al.* (1993).

La solution fromagère (comme décrite dans la partie dosage de protéines) est centrifugée (10 000 g/30 min/4°C), la matière grasse est écartée. Le surnageant est filtré puis acidifié à pH 4,6. Le surnageant est centrifugé (6000 g/15 min/4°C) puis filtré (Whatman n°42). 100 μ L du filtrat dilué à 1/25^{ème} dans de l'eau distillée sont mélangés avec 1 mL de tampon borate (0,1 M, pH 9,5) et 400 μ L de TNBS (0,1%, p/v) puis incubées pendant 1 h à 37°C à l'obscurité. La réaction est stoppée par addition de 0,4 mL de solution phosphate/sulfite de sodium (NaH₂PO₄, 2 mM et Na₂SO₃, 18 mM) préparée extemporanément. L'absorbance est mesurée à 420 nm contre un blanc réalisé avec de l'eau distillée. À l'aide d'une gamme étalon de la glycine (0,01-0,5 mM), les résultats sont exprimés en mEq glycine/g de protéine (Figure 19).

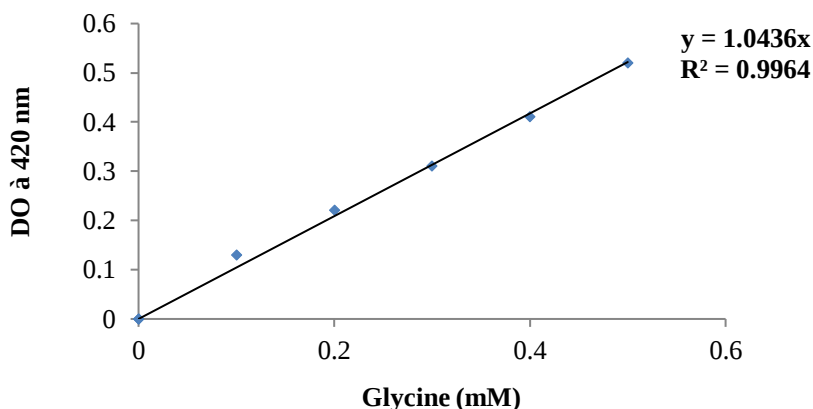


Figure 19: Courbe étalon utilisée pour le dosage des groupements NH₂ libres.

2.2.5.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS)

L'électrophorèse est basée sur le déplacement de molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Le support sur cuves verticales le plus utilisé pour cela est le gel de polycarylamide (PAGE) en raison des avantages qu'il présente (transparence, reproductibilité, tamisage...etc). Ce gel a une structure semi-solide issue de la polymérisation entre de l'acrylamide et du bis-acrylamide, qui forment un réseau tridimensionnel, résultant du greffage d'unités de N, N-méthylène-bis-acrylamide ($C_7H_{10}N_2O_2$) sur des chaînes de polyacrylamide ($-CH_2=CH-CO-NH_2-$). La polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium $(NH_4)_2S_2O_8$ et de N,N,N,N-tetraméthylènediamine (TEMED).

En conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS), les protéines sont séparées seulement sur leur taille et leur forme, car l'ajout du détergent anionique, qui est le SDS élimine l'effet de charge, en conférant une charge nette négative à toutes les unités présentes dans le milieu (le SDS va se fixer par excès aux protéines, à raison de 1,4 g/g protéines). Dans ces conditions, il est d'usage d'utiliser aussi un chauffage des échantillons à 100°C/ quelques minutes pour mieux solubiliser les solutés et dénaturer les protéines (déplissement des structures 3D), en combinaison avec un agent réducteur pour rompre les ponts S-S.

Ce type d'électrophorèse est réalisé en superposant deux gels de porosités différentes : le premier (gel de concentration) va permettre aux entités de tailles similaires d'arriver au même niveau sur la ligne de départ du gel de séparation, le second gel va séparer grâce à ses mailles les échantillons par tamisage moléculaire.

2.2.5.2.1. Préparation des échantillons

La PAGE-SDS est une technique indiquée pour suivre la protéolyse au cours de l'affinage des fromages, en utilisant les fractions solubles et insolubles à pH 4,6 de la solution fromagère (Chiang et Chang, 2005 ; Barac *et al.*, 2016a). Les fractions sont préparées selon les protocoles décrits par Verdini *et al.* (2004) et Dupas *et al.* (2009). 20 g de fromage (écrouté et broyé) sont mélangés avec 40 mL d'eau distillée jusqu'à la dissolution complète du fromage. La solution est mise sous agitation douce 1 h/40°C, son pH est ajusté à 4,6 puis l'ensemble est centrifugé (10 000 g/30 min/4°C). La matière grasse est écartée et le surnageant est filtré (Whatman N° 42) puis lyophilisé. Le culot est lavé 3 fois avec de l'eau distillée, dialysé contre de l'eau distillée 48 h /4°C, lyophilisé et utilisé sous cette forme dans les essais.

2.2.5.2.2. Réalisation de la PAGE-SDS

La PAGE-SDS est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) en utilisant un gel de séparation (15 %) et un gel de concentration (5 %). L'échantillon est déposé dans les puits à raison de 10 µL (1 mg/mL). L'électrophorèse est conduite sur mini-cuves (20 mA, 10 W et 250 V). A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont fixées dans une solution de TCA (12 %, p/v) pendant 45 min puis colorées par le bleu de Coomassie R250 (0,2 %). La décoloration du gel s'effectue dans un mélange : eau-méthanol-acide acétique (65/30/5, v/v/v). Un kit de marqueurs de masses moléculaires, élaboré au laboratoire LABAB est utilisé. Il comprend :

l'albumine sérique bovine (67 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), la β -Lactoglobuline (18 kDa) et l' α -Lactalbumine (14 kDa).

2.2.5.3. Chromatographie Liquide à Haute Performance

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC), dont l'appareillage utilisé est illustré (Figure 20), a été mise en œuvre pour le suivi de la protéolyse des fractions hydrosolubles (à pH4,6) des fromages aux différents stades d'affinage.

C'est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leur différence d'affinité pour une phase stationnaire apolaire et une phase mobile plus au moins polaire. La phase stationnaire comprend un support de particules de silice de 5 à 10 μ m de diamètre très poreux et un revêtement greffé de chaînes aliphatiques de plusieurs atomes de carbone qui renforcent l'hydrophobicité de la phase.

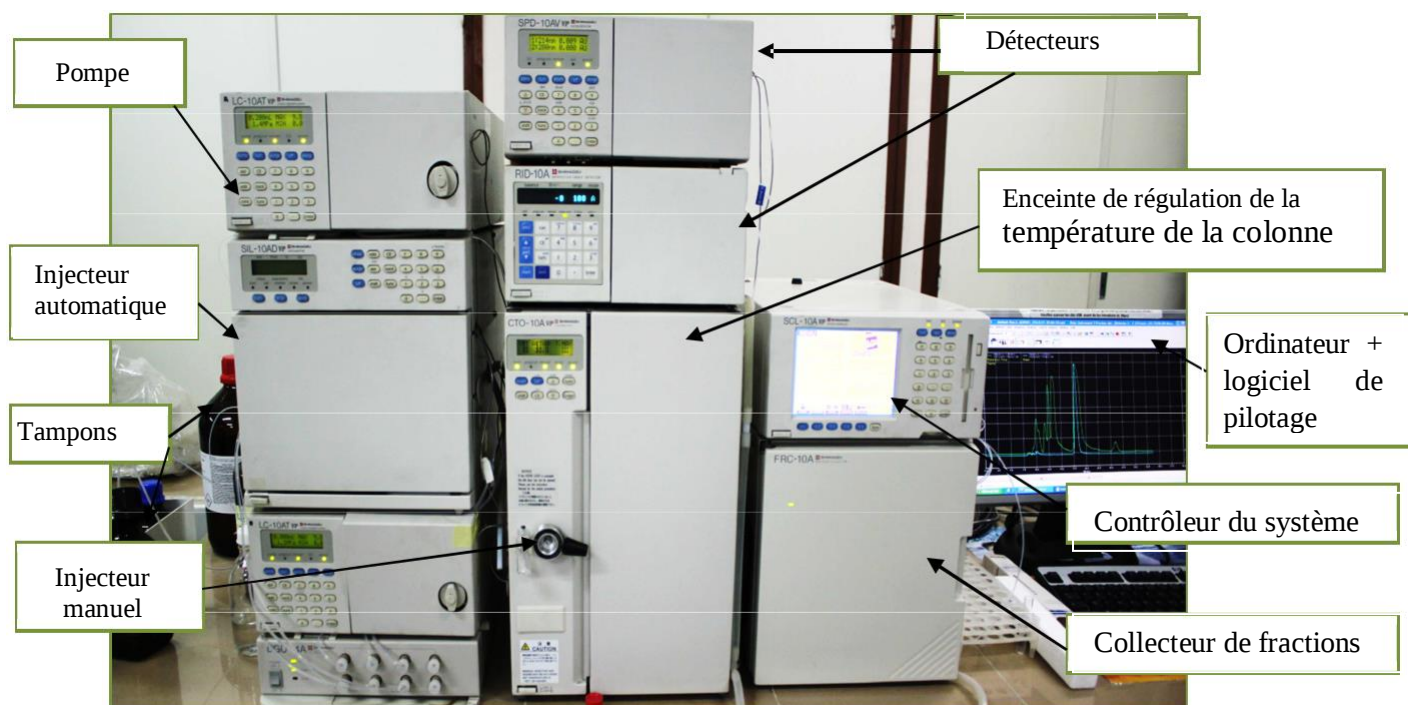


Figure 20 : Unité de chromatographie liquide de haute performance (RP-HPLC)

Les fractions hydrosolubles à pH 4,6 sont préparées à des concentrations de 3 mg/mL dans un tampon bis-Tris, pH 8. Elles sont ensuite injectées à raison de 20 μ g/mL dans une colonne Lichrosorb C8 (5 μ m, 125x4, 1mm). La phase mobile est constituée d'un solvant A (eau, acétonitrile, acide trifluoroacétique : TFA, respectivement de 90/10/0,1%, v/v) et d'un solvant B (eau, acétonitrile, TFA, 40/60/0,02 %). L'élution est conduite en utilisant un gradient binaire 0-50 % de solvant B pendant 50 min avec un débit de 0,2 ml/min et à 35°C. La détection se fait en UV à 214 nm.

2.2.6. Suivi de la lipolyse

La lipolyse est évaluée par le dosage des acides gras libres selon la méthode décrite par Deeth *et al.* (1975). 10 g de fromage (écrouté et broyé) sont dissous dans 5 mL de tampon citrate de sodium (0,5 M, pH 7). 4 mL de ce mélange sont mélangés avec 10 mL de mélange de

solvant :Isopropanol-hexane-H₂SO₄ (4 N) (40/10/1, v/v/v). Le mélange est vortexé pendant 5 min puis 6mL d'hexane et 4mL d'eau distillée sont ajoutés. Le mélange est laissé à décanter pendant 15 à 20 min, dans une ampoule à décantation. 5 mL du surnageant sont titrés avec de NaOH éthanolique (0,01N) en présence de phénolphthaléine (1%). La teneur en acide gras libre est exprimée en équivalent acide oléique/100g MG, en se référant à une courbe étalon réalisée avec l'acide oléique (2-10 mg/mL) (Figure 21).

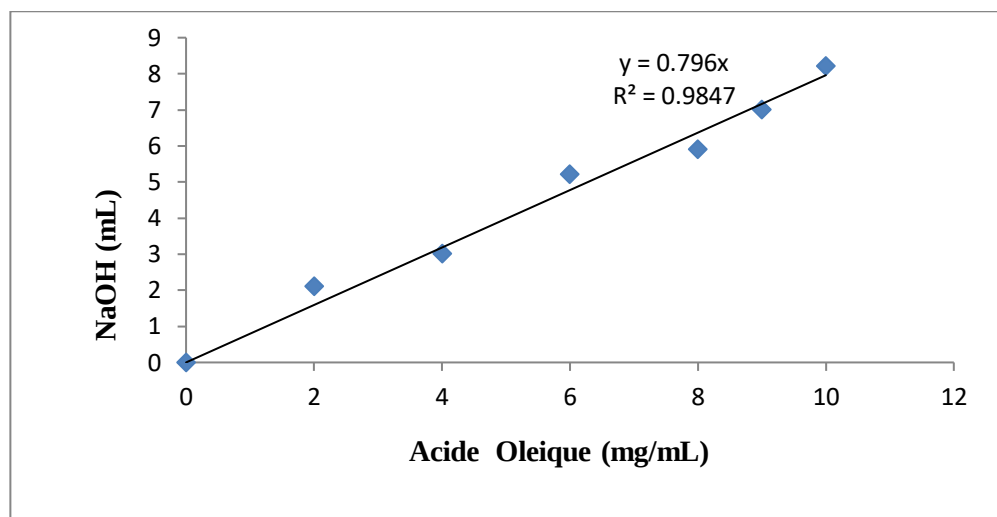


Figure 21: Courbe étalon pour le dosage des acides gras libres par la méthode de Deeth *et al.* (1975).

2.2.7. Evaluation de l'activité antioxydante

En raison de la nature complexe des antioxydants, plusieurs techniques ont été développées pour mesurer l'activité antioxydante des hydrolysats de protéines (Power *et al.*, 2013). Lors de la présente étude, la réaction du DPPH et le pouvoir réducteur ont été choisis pour déterminer l'activité antioxydante aux différents stades d'affinage, en utilisant les lyophilisats des fractions solubles et insolubles (comme décrit dans la section PAGE-SDS) à raison de 10 mg/mL.

2.2.7.1. Test du DPPH

Le test utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), est une méthode colorimétrique basée sur la réduction du radical libre DPPH. En effet, la réduction de cette molécule est caractérisée par un changement de coloration de la solution qui passe du violet au jaune (Figure 22). Le radical libre DPPH a un max d'absorption à 517 nm. La protonation (hydrogénation) de ce radical induit une diminution de cette absorbance.

La détermination de l'activité antiradicalaire des solutions fromagères par le test du DPPH a été effectuée selon la méthode de OzturketAkin (2017) avec quelques légères modifications. Brièvement, 1mL d'échantillon (fractions soluble ou insoluble) est mélangé avec 2mL de la solution DPPH à 0,1 mM. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc constitué d'eau distillée.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$A(\%) = \frac{(\text{Abs Contrôle} - \text{Abs } \square \text{chantillon})}{\text{Abs Contrôle}} \times 100$$

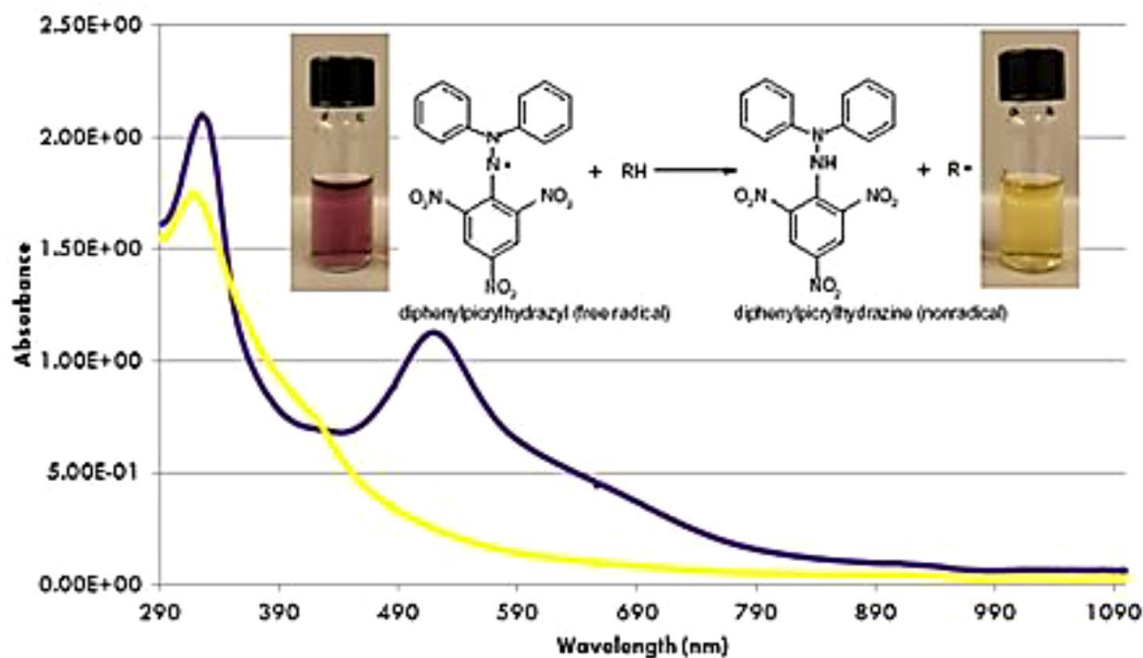


Figure 22: Spectre d'absorption UV du DPPH avant et après réaction avec un antioxydant.

Le résultat est confronté à une courbe d'étalonnage de la vitamine C comme standard dans les mêmes conditions (Figure 23).

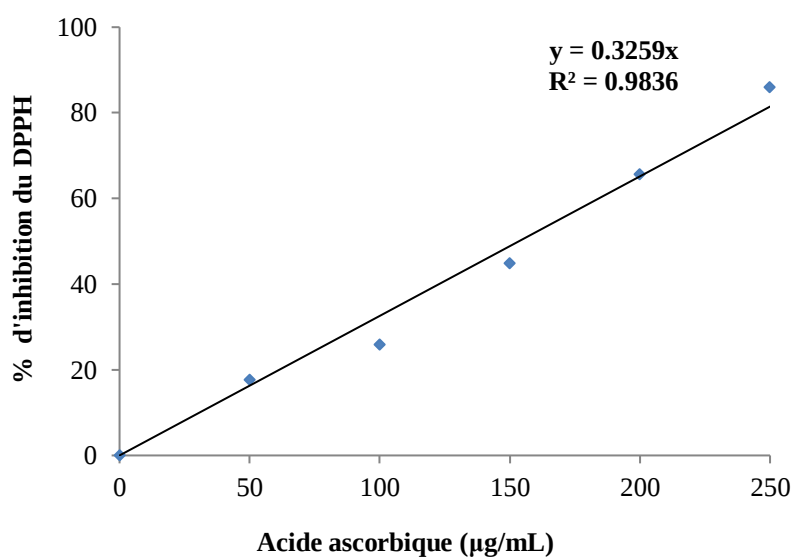


Figure 23: Courbe d'étalonnage relative à l'inhibition du DPPH (%) en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

2.2.7.2. Pouvoir réducteur ou test FRAP

Le pouvoir réducteur (FRAP : FerricReducingAntioxidant Power) d'un échantillon est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des échantillons testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton qui survient chaque fois qu'une molécule d' H_2O_2 est en contact avec les ions Fe^{2+} et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyl (OH), un des radicaux les plus réactifs. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés.

Le pouvoir réducteur de la solution fromagère a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986). 0,5 mL d'échantillon (fractions soluble ou insoluble) a été mélangé avec 2,5 mL tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (1%) puis incubé au bain Marie 50°C/20 min. Après l'incubation, 5 ml de l'acide trichloracétique (TCA) (10%) sont ajoutés au mélange. Le mélange est centrifugé 4000 g/10 min, puis 2,5 mL du surnageant recueilli sont mélangés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de FeCl_3 (0,1 %). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Le résultat est confronté à une courbe d'étalonnage de la vitamine C comme standard dans les mêmes conditions (Figure 24).

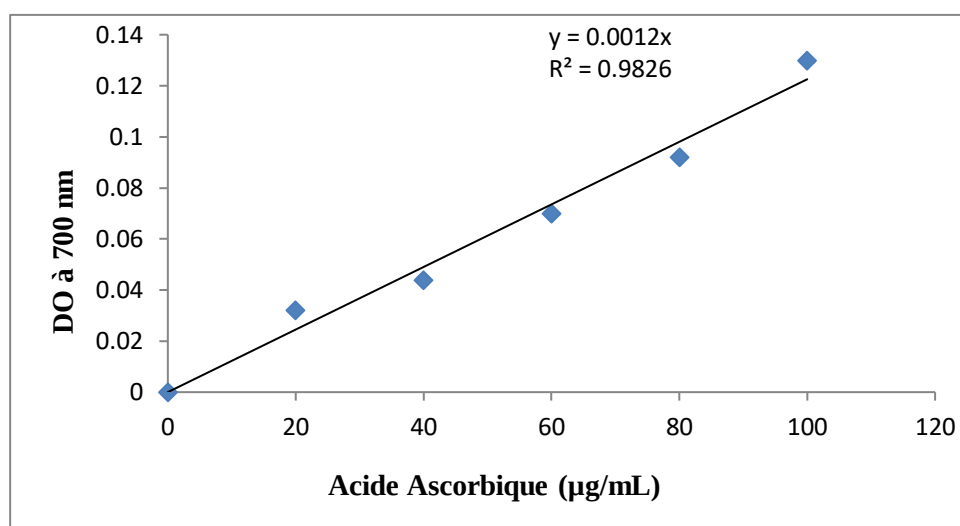


Figure 24: Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur (FRAP).

2.2.8. Microflore du lait et du Camembert

2.2.8.1. Dénombrement de la microflore du lait et son évolution dans les fromages

Le dénombrement de la microflore du lait et du fromage au cours de l'affinage sont réalisés par la recherche de certains germes, dont les conditions d'incubation et les milieux utilisés sont représentés dans le Tableau VIII.

Les dilutions sont effectuées soit directement à partir du lait soit à partir d'une solution fromagère préparée selon la méthode décrite par Lenoir (1963a) avec quelques modifications. Après séparation de la croûte, 10g d'échantillons sont homogénéisés dans un Stomacher 400 (SewardMedical, Londres, Royaume-Uni) avec 90 ml de citrate de sodium stérile (2%), préalablement portée à la température de 40°C. Des dilutions décimales du lait et de la solution fromagère sont réalisées avec une solution de Ringer diluée au quart.

Les résultats du dénombrement sont exprimés selon la formule décrite par Joffin C. et Joffin J.N. (1999) :

$$N \text{ (UFC/ml)} = \sum C / [(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$

$\sum C$: Nombre totale des colonies comptées dans les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 20 et 300 ;

n_1 : Nombre de boîtes de Pétri comptées de la 1^{ère} dilution ;

n_2 : Nombre de boîtes de Pétri comptées dans la seconde dilution ;

d : Facteur de dilution à partir duquel les 1^{ers} comptages ont été fait.

Tableau VIII: Flore microbienne recherchée du lait et du fromage au cours de l'affinage.

Microflore	Milieu de culture	Incubation	Références
Flore mésophile totale	PCA(en masse)	30°C/24-72 h	Gobbetti <i>et al.</i> , (2002)
Coliformes totaux	Gélose VRBL (en double couche)	30°C/24-48 h	
Coliformes fécaux		44°C/24-48 h	
Streptocoques fécaux	En ensemencement en surface sur Gélose BEA (bile esculine azide)	37°C/24-48h	Aggad <i>et al.</i> , (2009)
Lactobacilles mésophiles	Gélose MRS (en surface et en anaérobiose) suivi par test catalase et coloration Gram	30°C/24-48 h	Guizani <i>et al.</i> , (2002)
Streptocoques lactiques mésophiles	Gélose M17 (en surface et en anaérobiose) suivi par test catalase et coloration Gram	30°C/24-48 h	
Levures et Moisissures	Gélose OGA (en surface)	22°C/3-7 j	Tesone et Quevedo (1978)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-Test présomptif : bouillon Giolitti Cantoni, -Test confirmatif : Gélose Baird Parker avec test de coagulase	37°C/48 h	
<i>Salmonella sp</i> (25 g/225 mL)	Enrichissement sur bouillon SFB et isolement sur gélose Hektoen	37 °C/48 h	

2.2.8.2. Technique du Califronia Mastitis ou Test CMT

Afin de garantir l'innocuité du lait et du fromage au lait cru et l'éventuelle présence de mammite sub-clinique, dont *Listeria ssp* est largement incriminée dans ce genre de produits, les laits des vaches ont été soumis au test de California Mastitis (test CMT). Ce dernier a été conduit selon le protocole décrit par (Fedio *et al.*, 1990 ; Bourry *et al.*, 1995).

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative d'évaluation de la concentration en cellules somatiques du lait en fonction de l'état et du stade de l'inflammation mammaire. Il consiste à mélanger à volume égal (2mL) de lait, après avoir éliminé les premiers jets de lait, de chaque quartier de mamelle, avec le réactif de CMT (le Na-Teepol), dans chacune des coupelles correspondantes du plateau (en nombre de quatre : A, B, C, D). Ce dernier réagit avec l'ADN contenu dans les cellules somatiques du lait en provoquant leur lyse et la

formation d'un flocculat plus ou moins marqué. Une fois l'ADN et les histones exposés, le gel se forme par liaisons ioniques entre les histones chargées positivement et les têtes des molécules du détergent chargées négativement (Whyte *et al.*, 2005 ; Viguier *et al.*, 2009). L'importance et la consistance du précipité formé est alors fonction de la teneur en cellules de l'échantillon du lait (Annexe III). Dans notre cas, le réactif utilisé (Raïdex) possède en plus du Na-Teepol, un indicateur de coloration (pourpre de bromocrésol). La modification de phase vers la floculation et le changement de couleur du lait est considérée comme une réaction positive.

2.2.8.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

2.2.8.3.1 Préparation des fractions hydrosolubles de fromage

Les fractions brutes et les solutions fromagères hydrosolubles sont extraites à partir des fromages au 12^{ème} jour d'affinage sans acidification (Verdini *et al.*, 2004 ; Dupas *et al.*, 2009). Les prélèvements sont effectués à partir du centre du fromage afin de favoriser les conditions d'anaérobiose en réduisant ainsi l'effet de H₂O₂ sur l'activité antibactérienne (Hernandez *et al.*, 2005).

Après avoir dissous 20g de fromage dans 40 mL d'eau distillée, la solution est chauffée pendant 1h à 40°C dans un bain Marie jusqu'à avoir une solution homogène. Celle-ci est centrifugée (10 000 g/30 min/4°C). La matière grasse est écartée. La phase intermédiaire est récupérée, filtrée (filtre de 0,22µm) et constitue ainsi la fraction brute.

Les effets antagonistes du pH et du H₂O₂ sont éliminés par la neutralisation de la fraction brute avec NaOH (2 N) et par l'ajout de quelques gouttes de catalase (1 mg/ml) à la fraction neutralisée, après une période d'incubation de 1 h à 30°C. Les fractions brutes et neutralisées, exemptes de H₂O₂, sont filtrées sur des filtre de 0,22 µm (Schillinger et Luke, 1989 ; Yang *et al.*, 2012 ; Sahraoui *et al.*, 2015).

2.2.8.3.2. Revivification et préparation des inocula bactériens

2.2.8.3.2.1. Revivification et contrôle de pureté de souches.

Escherichia coli ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ont été conservées dans le bouillon BHIB à 50%glycérol au niveau du laboratoire LABAB Université de Tizi-Ouzou.

Après décongélation, une double revivification de 12h dans le bouillon BHIB, suivi d'un repiquage sur gélose BHIB est nécessaire pour éliminer le stress physiologique. La pureté des souches et la confirmation de leur identification ont été effectuées : *Escherichia coli* ATCC 25922 (Catalase, Oxydase, Gram et galerie API 20E), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Catalase, Oxydase, Gram, Coagulase et ADNase).

2.2.8.3.2.2. Contrôle de la pureté des souches

2.2.8.3.2.2.1 Test de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), formé comme sous-produit des processus métaboliques.

2.2.8.3.2.2.2. Test de l'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celles des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. Elle catalyse une réaction d'oxydo-réduction, en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H_2O ou en eau oxygénée H_2O_2 . Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, qui est un composant du réactif de la recherche de la cytochrome oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés. Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif : N-diméthylparaphénylène diamine, sur lequel nous avons déposé une colonie. La lecture du résultat est immédiate et sans incubation.

2.2.8.3.2.2.3. Galerie API 20 E

La galerie API 20 E (figure 25) a été utilisée afin de confirmer l'appartenance de la souche à l'espèce *Escherichia coli*. Le principe de cette méthode est basé sur l'ensemencement d'un inoculum de souche jeune (18 heures de standardisation à une DO de 0.08, pour une longueur d'onde de 620 nm) dans les micro-tubes de la galerie. L'incubation est réalisée à 37°C/24h. Après cette période d'incubation, les résultats sont notés. L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Ce dernier est obtenu en séparant les tests par groupe de trois et une valeur 1,2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives. On obtient alors 7 chiffres : la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} est affectée de la valeur 4. L'appartenance de la souche à *E. coli* ATCC 25922 est déterminée en entrant son profil numérique (de résultats positifs) dans le logiciel APIWEB (service microbiologie médicale CHU-Tizi Ouzou).



Figure 25: Galerie API 20 E utilisée pour l'identification *E. coli* ATCC 2522

2.2.8.3.2.2.4. Test de la coagulase

Ce test permet de mettre en évidence les Staphylocoques à coagulase positive. Ce dernier est réalisé par le mélange de 1mL d'une culture de *S. aureus* ATCC25923 sur le bouillon cœur cerveau (BHIB), mélangé avec 1mL de plasma de lapin. Un témoin négatif est effectué dans les mêmes conditions dans du bouillon BHIB exempt de plasma. L'incubation est faite à 37°C et la coagulation du plasma est suivie pendant une période allant de 1 à 4h d'incubation.

2.2.8.3.2.2.5. Test de la désoxyribonucléase (ADNase)

L'ADNase est une enzyme qui a la capacité d'hydrolyser l'ADN. Cette enzyme est recherchée pour la culture des souches à tester sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose à ADN (Conda Pronadisa, Espagne). Les colonies prélevées sur milieu Chapman sont ensemencées au centre de la gélose à ADN, puis sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Après une inondation de la boîte de Pétri avec la solution de toluidine 0,1M, la mise en évidence de cette enzyme est révélée par l'apparition d'une zone rose autour de la strie. Le reste de la boîte demeure bleu. Le bleu de toluidine colore les nucléotides, produits sous l'effet d'ADNase, en rose.

2.2.8.3.2.3. Préparation des inoculas bactériens

La standardisation des souches a été effectuée par la mesure de l'absorbance de cultures jeunes de 18 h à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm jusqu'à avoir une densité optique de 0,08-0,1 (10^8 UFC/mL), selon les recommandations du réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (2011).

2.2.8.3.3. Détermination de l'activité antibactérienne

2.2.8.3.3.1. Méthode des disques

La technique de diffusion sur disques est réalisée selon le protocole cité par Motta et Brandelli (2002). Cinq disques de papier stériles de 6 mm sont déposés sur la gélose Mueller Hinton (MH, 0,7 % agar) préalablement ensemencée par écouvillonnage avec les suspensions bactériennes standardisées (*Escherichia coli* ATCC 25922 ou *Staphylococcus aureus* ATCC25923, 10^6 - 10^8 UFC/mL). Deux disques sont imprégnés avec 20 µL de la fraction hydrosoluble brute, deux disques avec 20 µL de la fraction hydrosoluble neutralisée dépourvue de catalase et un disque avec bouillon BHIB (témoin négatif). Les boîtes sont placées dans un réfrigérateur (4°C) pendant une heure pour une diffusion dans la gélose, ensuite les boîtes sont incubées à 37°C/ 24h. Les diamètres des zones d'inhibition apparues sont mesurés et les résultats sont exprimés en mm.

2.2.8.3.3.2. Technique en milieu liquide

Pour confirmer l'effet barrière des fractions hydrosolubles contre la contamination du fromage artisanal, le test d'antagonisme des fractions fromagères hydrosolubles, neutralisées, exemptes de H₂O₂ en milieu liquide, a été effectué selon la méthode de macro-dilution décrite par Das *et al.* (2010). Ceci par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm.).

Nous avons modifié la méthode de microplaque décrite par Pellegrini *et al.* (2001) par trois séries de tubes eppendorfs contenant chacune 12 eppendorfs (Figure 26). Chaque eppendorf correspond à une durée d'incubation précise. La première série est composée d'eppendorfs remplis avec 0,1mL d'inoculum et 1,9mL de BHIB (Témoin). La deuxième série est composée d'eppendorfs remplis avec 0,1 mL d'inoculum, 0,1 ml extrait fromager brut et 1,8mL de BHIB. La troisième série est composée d'eppendorfs remplis avec 0,1 mL d'inoculum, 0,1 ML d'extrait fromager neutralisé dépourvu de H₂O₂ et 1,8 ml de BHIB. La présence de l'activité antimicrobienne se traduit par la diminution de la DO à 620nm au cours du temps. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition(\%)} = [(\text{DO}_{\text{contrôle}} - \text{DO}_{\text{échantillon}}) / \text{DO}_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Séries	Contenance des tubes	Lecture de DO _{λ620nm} aux différents temps d'incubation											
		02h	04h	06h	08h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
N°1	0,1 mL inoculum (10 ⁶ UFC/mL)+ 1,9 mL BHIB												
N°2	0,1 mL inoculum (10 ⁶ UFC/mL) + 0,1 mL extrait brut + 1,8 mL BHIB												
N°3	0,1 mL inoculum (10 ⁶ UFC/mL) + 0,1 mL extrait neutralisé + 1,8 mL BHIB												

Figure 26 : Schéma de réalisation du test d'antagonisme des extraits de fromages.

2.2.9. Analyses statistiques

Les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des laits ont été évalués par le test de Student (au seuil de 5%). L'évolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques au cours de l'affinage des fromages a été réalisée par le test ANOVA. Quand les différences sont significatives au seuil de 5%, une comparaison multiple par paire est effectuée. L'analyse en composante principale (ACP) en utilisant l'indice de corrélation de Pearson est effectuée afin d'étudier l'impact du type et du stade d'affinage sur les interactions physico-chimiques et microbiologiques au cours de la maturation des fromages. Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel STATbox 6.4. L'analyse statistique de l'activité antibactérienne en milieu liquide des extraits hydrosolubles des fromages sur *E. coli* et *S. aureus* a été réalisée par le test de Kruskal-Wallis (au seuil de 5%).

Résultats et discussion

III- Résultats et discussion

3.1. Evaluation de la phase d'affinage des fromages fabriqués

3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des laits et des fromages

3.1.1.1 analyses des laits

La composition physico-chimique des laits (tableau IX) montre qu'il n'y a pas de différence significative sur l'ensemble des paramètres analysés, sauf pour les teneurs en extrait sec total (EST) et en protéines, qui sont plus élevées dans le lait cru ($p < 0.05$). Cela pourrait être dû aux conduites d'élevage et d'alimentation. Il peut être aussi expliqué par le fait que le lait provenant du centre de collecte est un mélange de laits issus de différents élevages, ce qui pourrait se traduire par la diminution des teneurs finales en protéines, matières grasses ou matières sèches. Ceci expliquerait les teneurs plus faibles en EST et en protéines dans le lait pasteurisé, par rapport au lait cru. Ce dernier provient toujours du troupeau d'un même élevage.

Globalement, ces résultats mettent en relief aussi la faiblesse du lait de collecte en protéines (taux inférieur à 30g/L). Ceci est une donnée relativement constante qui se confirme pratiquement pour la grande majorité des analyses de plusieurs centres de collectes implantés dans la région centre du pays (Kaouche, 2015). Ces taux relativement carencés seraient directement liés à la nature de l'alimentation ingérée par les vaches, où l'apport en herbes verts et en fourrages se trouvent déficitaires (Kaouche, 2015 ; Makhlouf *et al.*, 2017).

Concernant l'effet de la saison. Il est écarté dans cette étude, car les prélèvements ont été effectués pendant les mêmes périodes. Signalons que des travaux ont montré que les teneurs du lait, en matières grasses et protéiques, évoluent de façon inversement proportionnelle à la quantité de lait produit. Cette quantité est maximale au mois de juin et minimale en décembre, à l'inverse, les taux butyreux et protéiques sont les plus faibles en été et les plus élevés en hiver (Jarrige et Rossetti, 1957 ; Spike et Freeman, 1967 ; Wood, 1969).

La saison agit essentiellement par l'intermédiaire de la durée du jour. En effet, l'augmentation expérimentale de la durée d'éclairement (15 à 16 h par jour) augmente la production laitière et diminue la richesse du lait en matières utiles (MG et protéines). Cela est expliqué par les effets conjugués de l'augmentation des quantités d'aliments ingérés et à la modification des équilibres hormonaux, notamment la prolactine, qui entraîne une diminution des taux butyreux et protéiques (Peters *et al.*, 1981 ; Stanisiewski *et al.*, 1985 ; Phillips et Schofield, 1989 ; Bocquier *et al.*, 1997).

Tableau IX : Analyses des paramètres physico-chimiques des laits utilisés dans les fabrications fromagères.

EST : extrait sec total ; MG : matière grasse ; PT : protéine total

	Lait cru	Lait pasteurisé
pH	6,69 ^a ±0,0187	6,66 ^a ±0,0648
Acidité Titrable (°D)	17 ^a ±0,935	15,66 ^a ±0,4082
Densité	1,033 ^a ±0,00744	1,027 ^a ±0,00707
EST(g/l)	122,1 ^b ±0,3082	108,133 ^a ±2,313
MG g/l)	33,66 ^a ±2,160	36 ^a ±0,612
PT(g/l)	29,45 ^b ±0,0935	26,66 ^a ±0,4082

Moyennes significativement différentes ($p < 0,05$), si elles sont affectées de lettres différentes.

3.1.1.2. Analyses des fromages

L'évolution des paramètres physicochimiques au cours de l'affinage des fromages est donnée dans le tableau X.

Le pH et l'acidité titrable évoluent de façon inversement proportionnelle au cours de l'affinage. L'analyse de la variance montre des différences significatives du pH et de l'acidité titrable ($p < 0.05$) entre les types de fromages et leurs stades d'affinage.

Les pH passent de 4,59 (CA) et 4,67 (CI) aux pH de 5,13 et 5,36 pour le fromage artisanal et industriel, respectivement pour le 1^{er} jour et le 12^{ème} jour d'affinage. Cette augmentation, même si elle n'est pas intense, est une conséquence de la désacidification des fromages. L'acidité des fromages diminue entre les premiers jours (CA : 9,59% ; CI: 9,11%) et la fin de l'affinage (CA: 5,83% ; CI : 6,16%).

Il est notamment établi que l'assimilation de l'acide lactique par la flore fongique d'affinage (notamment *P. camemberti* et *G. candidum*) fait augmenter le pH du fromage, favorisant ainsi l'action des enzymes protéolytiques qui, en libérant le NH_3 , conduit à la neutralisation et à la désacidification des fromages, ce qui se traduit avec la diminution de l'acide lactique et l'augmentation des indices de protéolyse (ASN% et NPN%) et des AAL (%) (Baribo et Foster 1952 ; Le Graet *et al.*, 1983 ; Lenoir, 1984 ; Curtin *et al.*, 2001; Fallico *et al.*, 2004 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004 ; Spinnler et Gripon, 2004; Martin *et al.*, 2007; Lessard *et al.*, 2012).

Cette constatation a été vérifiée dans le cas de nos essais où les indices de protéolyse (ASN, ANP, AAL) ont augmenté avec le temps d'affinage. Cet effet est conforté par les résultats de l'ACP (Tableau X).

Tableau X: Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'affinage des fromages (artisanal / industriel).

Paramètres physico-chimiques	Types de fromage	Jours d'affinage			
		1	4	6	12
pH	Artisanal ^A	4,589 ^a ± 0,384	4,601 ^a ± 0,499	4,904 ^{ab} ± 0,353	5,129 ^{ab} ± 0,3814
	Industriel ^B	4,673 ^{ab} ± 0,537	4,946 ^{ab} ± 0,418	5,284 ^{ab} ± 0,399	5,358 ^b ± 0,4634
Acidité titrable (a. lactique %)	Artisanal ^B	9,594 ^f ± 0,188	8,701 ^{de} ± 0,429	8,06 ^{cd} ± 0,416	5,833 ^a ± 0,232
	Industriel ^A	9,114 ^e ± 0,643	7,904 ^c ± 0,394	7,04 ^b ± 0,524	6,166 ^a ± 0,222
EST (%)	Artisanal ^A	39,407 ^a ± 2,49	41,839 ^{ab} ± 4,468	48,11 ^b ± 4,484	50,089 ^c ± 2,572
	Industriel ^A	40,89 ^a ± 4,613	42,608 ^{abc} ± 3,406	47,113 ^{bcd} ± 2,594	49,513 ^d ± 2,98
MG (%)	Artisanal ^A	18,756 ^a ± 0,82	20,15 ^a ± 0,688	23,706 ^b ± 0,772	25,992 ^c ± 0,440
	Industriel ^B	22,957 ^b ± 1,527	23,611 ^b ± 1,921	27,106 ^{cd} ± 1,588	28,751 ^d ± 1,645
PT (%)	Artisanal ^A	10,007 ^a ± 1,339	12,067 ^b ± 1,555	14,19 ^c ± 0,634	15,248 ^c ± 0,674
	Industriel ^B	12,173 ^b ± 0,323	14,27 ^c ± 0,770	15,296 ^c ± 0,848	17,202 ^d ± 0,783

Les données dans la même ligne ou colonne pour le même paramètre avec des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$. **PS** : protéines sériques ; **PT** : protéines totales

Les teneurs en extrait sec total (EST) des fromages augmentent au fur et à mesure que la maturation se prolonge dans le temps avec des différences significatives entre les types et les stades d'affinage. Ces teneurs passent de 39,40 % (CA) et 40,89 % (CI) au 1^{er} jour d'affinage à 49,51 (CI) et 50,08 (CA) au 12^{ème} jour d'affinage.

Cette concentration de l'EST peut être attribuée à la perte d'eau et aux échanges gazeux dans les hâloirs d'affinage, ce qui fait augmenter aussi les teneurs en matières grasses et protéiques des fromages (Figure 27). En effet, au dernier jour d'affinage, les teneurs en MG et en protéines atteignent les valeurs de 25,99 ; 28,75% pour le fromage (CA) et de 15,24 et 17,20 %, pour (CI).

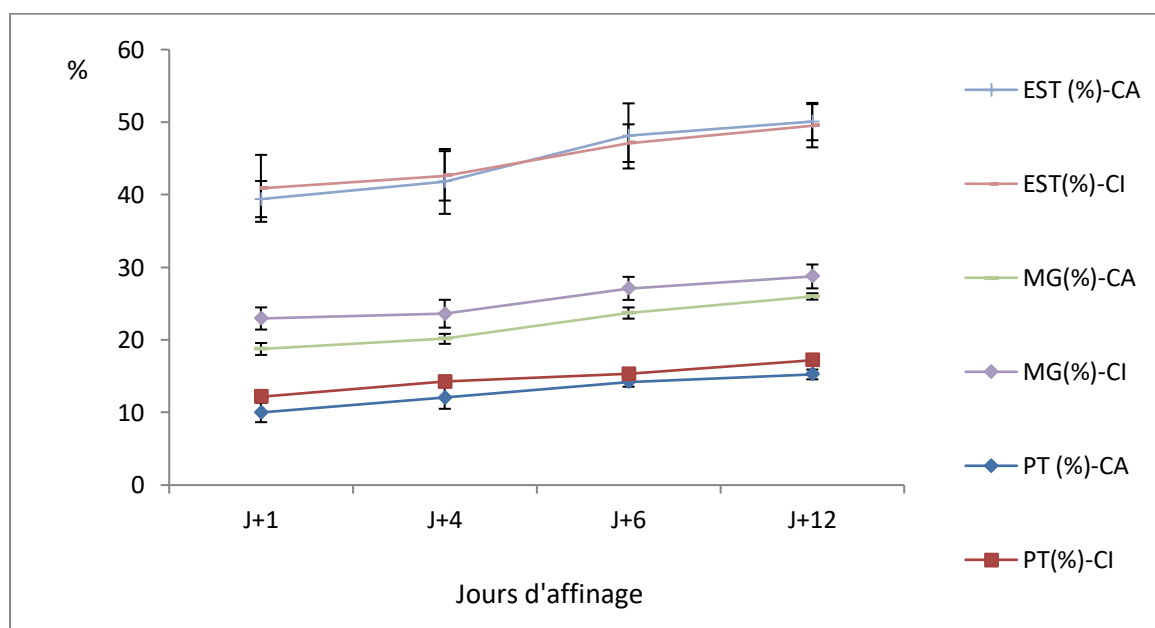


Figure 27 : Evolution des paramètres (EST, MG et Protéines) au cours de l'affinage des fromages type Camembert fabriqués à partir du lait cru (CA) ou du lait pasteurisé (CI).
EST : extrait sec total ; MG : Matières grasses ; PT : protéines

Nous pouvons constater, au vue des résultats obtenus, que la perte en eau lors de l'affinage est un phénomène commun aux deux types de fromages affinés analysés , mais dont l'intensité d'évaporation dépend du type et de la technologie utilisée.

Ceci est d'ailleurs une constante pour les fromages admis dans un hâloir. En effet, la diminution de l'humidité et son impact sur l'augmentation des teneurs en MS, MG et en protéines a été décrit lors de l'affinage des fromages à pâtes dures ou à pâtes molles comme le Camembert. Cette perte en eau est, selon ces travaux, la conséquence du phénomène d'évaporation d'eau en surface et aux échanges de composés volatils (ammoniac, acides gras volatils...etc.) entre la surface des fromages et l'environnement des hâloirs d'affinage (Schlesser *et al.*, 1992 ; Salvat-Brunaud *et al.*, 1995 ; Hassouna *et al.*, 1996 ; Thierry *et al.*, 1998 ; Boutrou *et al.*, 1999 ; Pierre *et al.*, 1999 ; Engel *et al.*, 2001 ; Boutrou *et al.*, 2001 ; Bertolino *et al.*, 2011).

3.1.2. Evolution de la protéolyse et de la lipolyse au cours de l'affinage

3.1.2.1. Évaluation des indices de la protéolyse par dosage des fractions

La protéolyse a été suivie par l'évolution des ratios ASN / PN (ASN%) et NPN / PN (NPN%), appelés indice de protéolyse et qui sont utilisés par plusieurs auteurs, comme indicateurs d'affinage du fromage afin d'estimer le degré de protéolyse (Kum *et al.*, 1991 ; Richoux et Kerjean, 1995; McSweeney et Fox, 1997 ; Leclercq-Perlat, 2000). L'évolution des indices de la protéolyse et de la lipolyse est présentée dans le tableau XI.

Tableau XI: Evolution des protéines solubles, azote non protéique, acides aminés libres et acides gras libres au cours de l'affinage des fromages (artisanal/industriel) fabriqués.

Paramètres physico-chimiques	Type de fromage	Jours d'affinage			
		1	4	6	12
PS % (PS/PT)	Artisanal ^B	5,222 ^a ± 0,547	5,522 ^a ± 0,528	12,490 ^b ± 0,592	22,241 ^d ± 2,876
	Industriel ^A	4,697 ^a ± 0,272	4,626 ^a ± 0,335	6,972 ^a ± 0,425	17,444 ^c ± 2,85
ANP % (ANP/PT)	Artisanal ^B	0,313 ^b ± 0,076	0,341 ^b ± 0,059	0,42 ^c ± 0,032	0,442 ^c ± 0,037
	Industriel ^A	0,218 ^a ± 0,028	0,225 ^a ± 0,035	0,215 ^a ± 0,032	0,285 ^{ab} ± 0,046
AAL (mEqgly/g PT)	Artisanal ^A	0,117 ^{ab} ± 0,0353	0,148 ^{bc} ± 0,005	0,186 ^{cd} ± 0,025	0,246 ^e ± 0,0219
	Industriel ^B	0,095 ^a ± 0,004	0,132 ^{ab} ± 0,003	0,211 ^{cd} ± 0,0307	0,227 ^d ± 0,0143
AGL (Eq a. oleique/100g MG)	Artisanal ^B	0,907 ^a ± 0,3081	2,044 ^c ± 0,0067	2,609 ^d ± 0,38	3,19 ^e ± 0,179
	Industriel ^A	0,992 ^a ± 0,1071	1,227 ^{ab} ± 0,142	1,286 ^{ab} ± 0,0074	1,407 ^b ± 0,227

Les données dans la même ligne ou colonne pour le même paramètre avec des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$. **PS** : protéines solubles ; **ANP** : azote non protéique ; **AAL**: acide amine libre; **AGL** : acide gras libre.

Les analyses statistiques ont montré des différences significatives entre les types et les stades d'affinages des fromages. Les teneurs en protéines solubles augmentent du 1^{er} au 12^{ème} jour d'affinage avec des valeurs respectives allant de 5,22 à 22,24 % pour CA et de 4,69 à 17,44 % pour CI. Les valeurs d'azote non protéique passent de 0,31 à 0,44 % pour CA et de 0,21 à 0,28 % pour CI.

La protéolyse a été aussi mesurée par le dosage des acides aminés libres (AAL) (mEq glycine/g protéine). Ce dosage a montré des différences significatives selon les types de fromages. La différence des taux en AAL témoigne du niveau d'hydrolyse des caséines. En effet, les taux AAL passent de 0,12 (1^{er} jour) à 0,25(12^{ème} jour) dans le CA et de 0,09 (1^{er} jour) à 0,02 (12^{ème} jour) dans le CI.

L'absence de la pasteurisation du lait cru ainsi que l'action combinée de la microflore et des enzymes natives du lait cru, expliqueraient le degré élevé de la protéolyse dans le fromage artisanal, sachant que le traitement thermique du lait ralentit cette activité, en modifiant la flore totale et le système protéolytique qui s'expriment lors de l'affinage, notamment dans le Camembert (Coghill *et al.*, 1982; Van den Berg, 1984 ; Berdague *et al.*, 1990 ; Giaccone *et al.*, 2016; Frélin *et al.*, 2017).

Dans ce cadre, il a été rapporté que l'action de la plasmine sur les caséines diminue significativement avec l'augmentation des températures de chauffage (72°C/60s, 80°C/30s et 90°C/15s) dans les fromages à base de lait pasteurisé et dans les fromages à base de lait ultrafiltré (Benfeldt *et al.*, 1997 ; Benfeldt et Sorensen, 2001 ; Buffa *et al.*, 2001 ; Benfeldt,

2006). Notons que l'action protéolytique de la présure, de la plasmine, des protéases et peptidases microbiennes sur les caséines au cours de l'affinage, libèrent des peptides et des acides aminés, augmentant ainsi les indices d'affinages (ASN%, NPN%) et AAL% (Gripon *et al.*, 1975 ; Le Bars *et al.*, 1975 ; Desmazeaud et Vassal, 1979 ; Cerning *et al.*, 1987 ; Fox *et al.*, 1994 ; Gonzalez *et al.*, 2003 ; Upreti *et al.*, 2006). De plus, l'action éventuelle des enzymes intracellulaires, libérées lors de la lyse cellulaire, sur la protéolyse des caséines des fromages a été bien mis en relief par Saboya *et al.* (2001).

3.1.2.2. Suivi de l'évolution de la fraction soluble par RP-HPLC

Les profils RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 des deux fromages CA et CI, montrent une augmentation du nombre de pics au fur et à mesure que l'affinage se prolonge dans le temps (Figure 28). Cependant, il est permis de relever que le nombre de pics est plus élevé dans le fromage au lait cru (CA), par rapport à celui issu du lait pasteurisé (CI), ce qui conforte les résultats des dosages mentionnés plus haut, où la protéolyse dans le fromage artisanal est relativement plus intense.

Cette observation est en accord avec celles de Benfeldt et Sorensen (2001) ainsi que Galli *et al.*, (2019), qui ont montré que les chromatogrammes obtenus en RP-HPLC des peptides solubles à pH4,6, prélevés au niveau de l'affinage, diminuent considérablement selon le traitement thermique subi par le lait de départ, alors que ceux provenant des laits crus présentent des profils plus complexes avec un nombre de pics plus élevés.

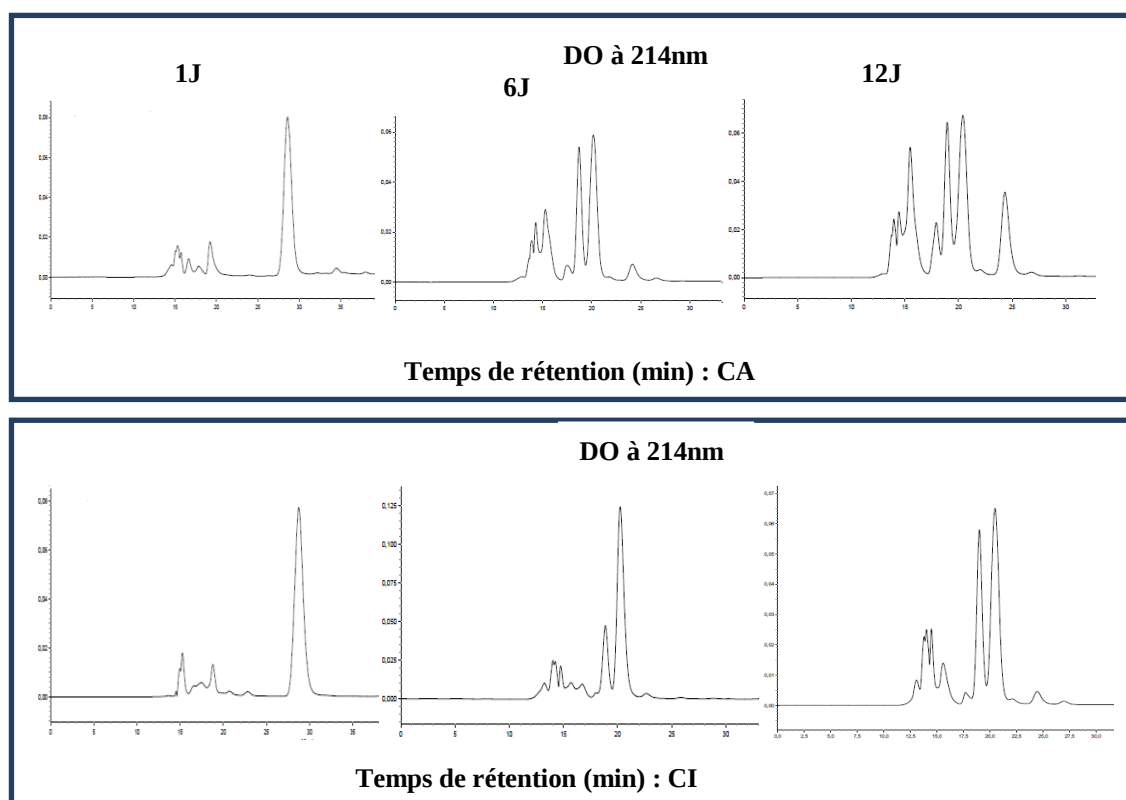


Figure 28: Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC, colonne C8) des fractions hydrosolubles, au cours de l'affinage des fromages (artisanal, CA / industriel, CI) fabriqués

Selon Trujillo *et al.* (1997) et Van Hekken *et al.* (2007), la plupart des peptides libérés lors de l'affinage des fromages et ayant un poids moléculaire compris entre 10 et 20 kDa, proviennent de l'hydrolyse des caséines par la présure et la plasmine.

3.1.2.3. Suivi par électrophorèse de la fraction soluble et insoluble

La figure (29a) montre que la caséine native migre en deux bandes principales correspondant à α s-CN et à β -CN. L'intensité de ces bandes diminue au cours de l'affinage laissant apparaître de nouvelles bandes de faible poids moléculaire. Cette diminution est plus prononcée au 12^{ème} jour de l'affinage du CA. Ces profils montrent que la protéolyse des caséines évolue en fonction du temps et du type de fromage avec des degrés protéolytiques très prononcés pour α s-CN par rapport à β -CN.

Parallèlement, nous observons, au fur et à mesure du temps de maturation des fromages, l'apparition, dans les fractions hydrosolubles de nouvelles bandes protéiques, plus intenses dans le cas du fromage artisanal. Ces fragments seraient des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines initiales (Figure 29b).

Les résultats de ce suivi électrophorétique sont en accord avec ceux des diagrammes chromatographiques réalisés en RP-HPLC. Ils confirment l'élévation des indices protéolytiques et les taux d'acides aminés libres dans le fromage au lait cru par rapport à celui obtenu à partir du lait pasteurisé.

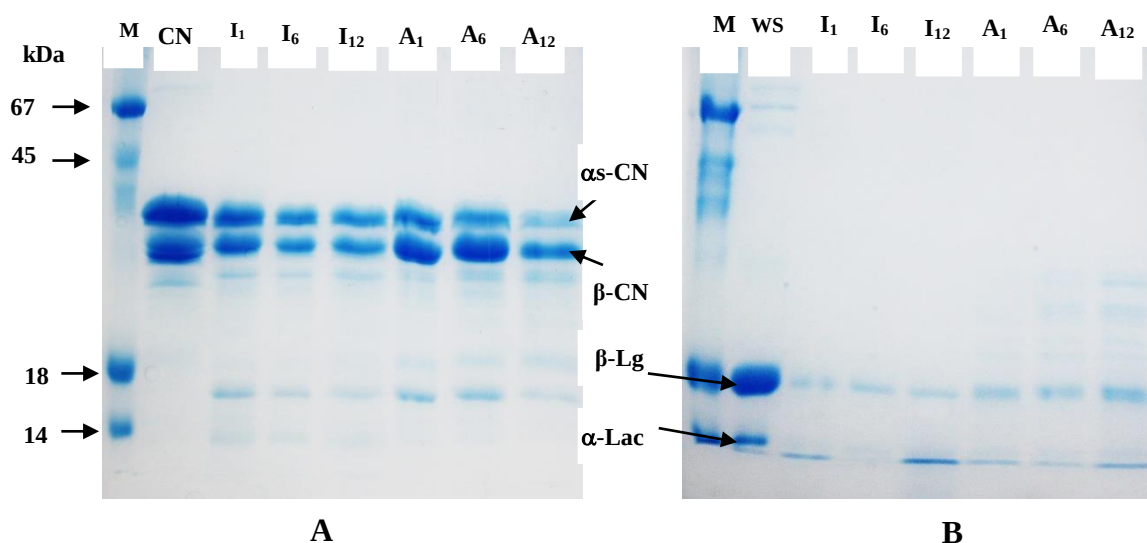


Figure 29: Electrophorégramme en PAGE-SDS de la fraction insoluble (A) et soluble (B) à pH 4,6 au cours de l'affinage des deux fromages artisanal (A) et industriel (I).
Gel de séparation : T = 15 %, C = 2,7 % ; gel de concentration : T = 4 %, C = 2,7 %

Il est à signaler que les tendances dégagées par la présente étude sont en accord avec celles signalées par Gobbetti *et al.* (1997). En 2002, ces mêmes auteurs ont montré que la chymosine hydrolyse facilement α s₁-CN par rapport à β -CN, avec libération d'un peptide identifié comme α s₁-I-caseine f(24-199).

La chymosine a également la capacité d'hydrolyser β -CN (Creamer et Mills, 1971 ; Addeo *et al.*, 1980 ; Carles et Ribadeau-Dumas, 1984). Le principal site de clivage de la chymosine dans β -CN est Leu192-Tyr193, mais en solution pure, elle peut hydrolyser β -CN

aux niveau de 7 sites produisant plusieurs peptides (f1-192, f1-189, f1-163/4/5 et f1-139), qui sont nommées respectivement $-\beta\text{-I}^{\text{I}}$, $-\beta\text{-I}^{\text{II}}$, $-\beta\text{-II}$ et $-\beta\text{-III}$ (Visser et Slangen, 1977 ; Visser, 1993).

Orlyuk et Stepanishchev (2014) ont montré qu'entre le 1^{er} et 21^{ème} jour d'affinage d'un fromage à pâte molle type Camembert, la quantité d' $\alpha\text{s-CN}$ diminue de 53 % et la teneur en $\beta\text{-CN}$ passe de 36,21 à 27,19 % et les pourcentages de l'azote soluble (riches en acide aspartique, sérine, acide glutamique, proline, alanine, phénylalanine et lysine) passent de 8 à 39 %.

Rappelons que la protéolyse au cours de l'affinage du Camembert est due principalement à l'action des protéinases issues de la présure (chymosine et pepsine), de la plasmine et des aspartyl et métallo-protéases de *Penicillium caseicolum*. Cependant, la présure semble être inactive sur $\beta\text{-CN}$ mais agit très tôt sur $\alpha\text{s}_1\text{-CN}$, avec une action similaire à celle de l'aspartyl-protéinase sur $\alpha\text{s}_1\text{-CN}$, par contre l'action de la plasmine sur $\beta\text{-CN}$ n'est visible qu'à partir du 21^{ème} jour, alors que la protéolyse de $\beta\text{-CN}$ par les aspartyl et les métallo-protéinases n'est détectable respectivement qu'après le 7^{ème} et le 10^{ème} jour d'affinage (Trieu-Cuot et Gripon, 1982 ; Mane et McSweeney, 2019).

3.1.2.4. Evolution de la lipolyse au cours de l'affinage

Le degré de la lipolyse mesuré par le dosage des acides gras libres montre que ces derniers augmentent au cours de l'affinage avec des différences significatives entre les stades d'affinage et les types de fromages (Tableau XII).

Tableau XII : Evolution de lipolyse au cours de l'affinage des fromages fabriqués

Lipolyse	Type de fromage	Jours d'affinage			
		1	4	6	12
AGL (Eq. acide oléique/100g MG)	Artisanal ^B	0,907 ^a ± 0,3081	2,044 ^c ± 0,0067	2,609 ^d ± 0,38	3,19 ^e ± 0,179
	Industriel ^A	0,992 ^a ± 0,1071	1,227 ^{ab} ± 0,142	1,286 ^{ab} ± 0,0074	1,407 ^b ± 0,227

Au dernier jour d'affinage, la teneur en AGL du CA est de 3,19 contre 1,407 pour le CI. Nous constatons que la lipolyse évolue avec le temps mis par les fromages dans les hâloirs, de la même manière que les indices protéolytiques. (Figure 30), ce qui est d'ailleurs relevé précédemment par Lavasani *et al.* (2012) ainsi que Batool *et al.* (2018), en analysant d'autres fromages.

La lipolyse des fromages peut être influencée, par la composition de la microflore microbienne, les enzymes du fromage et les traitements technologiques du lait. Le lait artisanal se singularise par la présence en son sein de la lipoprotéine lipase (LPL), qui serait paradoxalement absente dans les fromages au lait pasteurisé, vu que cette enzyme native est complètement inactivée à 78°C/10s. Sa présence dans le lait cru induit une forte lipolyse, mesurable par les taux d'AGL produits (Prieto *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2001 ; Prieto *et al.*, 2002 ; Mangia *et al.*, 2008). C'est d'ailleurs un résultat similaire qui est rapporté par McSweeney *et al.* (1993) et Bontinis *et al.* (2012). Ces auteurs ont relevé un degré de lipolyse plus élevé dans les fromages au lait cru, par rapport à ceux élaborés avec le lait pasteurisé ou ceux ayant subi la micro-filtration.

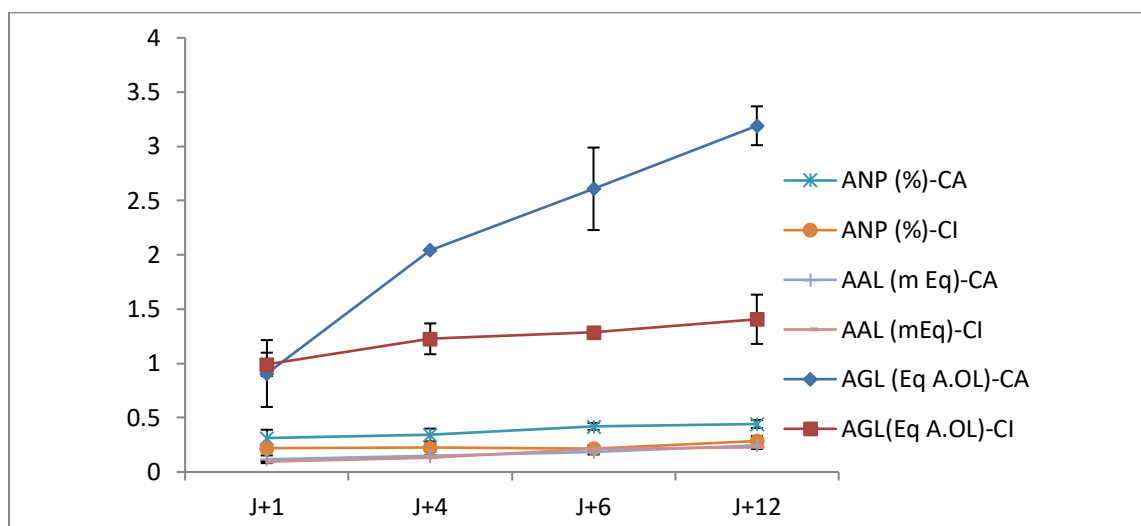


Figure 30 : Evolution des acides gras libres (AGL) et des indices de protéolyse aux différents stades d'affinage des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI).

De plus, l'effet de l'ajout de bactéries ou de champignons aux ferments habituels des fromages affectent considérablement le degré de la lipolyse, ceci a d'ailleurs été mis en relief sur le fromage Cheddar et Feta par plusieurs auteurs (Woo *et al.*, 1984 ; Madkor *et al.*, 2000 ; Kondylia *et al.*, 2002 ; Kesenkas et Akbul, 2008 ; Gupta *et al.*, 2009).

3.1.3. Evolution de la microflore au cours de l'affinage

3.1.3.1. Microflore présente dans le lait analysé

Les résultats du dénombrement des microorganismes des laits utilisés (lait cru pour la fabrication artisanale, lait pasteurisé pour la fabrication industrielle) sont présentés dans le tableau XIII, où on peut constater que l'ensemble des valeurs obtenues sont conformes aux normes établies (JORADP n° 39 du 2 juillet 2017).

Tableau XIII: Dénombrement de la microflore ($\log_{10}$ UFC/mL) des laits utilisés dans les essais de fabrications des fromages type Camembert (artisanal /industriel) fabriqués.

Microflore ($\log_{10}$ UFC/mL)	Lait cru	Lait pasteurisé
Flore mésophile aérobie totale	4,992 ^b $\pm$ 0,30659	3,7127 ^a $\pm$ 0,419
Coliformes totaux	1,663 ^b $\pm$ 0,1117	0,323 ^a $\pm$ 0,245
Coliformes fécaux	0,1966 ^b $\pm$ 0,1726	0,0033 ^a $\pm$ 0,00408
Streptocoques fécaux	0	0
Streptocoques lactiques mésophiles	2,49033 ^b $\pm$ 0,2248	0,4 ^a $\pm$ 0,1414
Lactobacilles mésophiles	3,6328 ^b $\pm$ 0,467	0,966 ^a $\pm$ 0,1779
Levures & Moisissures	1,5734 ^b $\pm$ 0,193	0,159 ^a $\pm$ 0,1947
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence
<i>Salmonella ssp</i>	Absence	Absence

Moyenne significativement différentes ($p < 0,05$) si elles sont affectées de lettres différentes.

L'absence des antibiotiques ainsi que les résultats négatifs du test de CMT des échantillons de laits analysés témoignent du respect des bonnes pratiques d'hygiène lors de la traite et aussi le respect des délais d'attentes après l'antibiothérapie, aussi bien par l'éleveur-fromager que les éleveurs affiliés au centre de collecte privé de la fromagerie industrielle.

Cependant, même se situant dans les limites tolérées et, en comparant les deux matières premières, on s'aperçoit que le nombre de germes est significativement plus élevé dans le lait cru par rapport au lait pasteurisé. Ceci est assez compréhensible du fait que le traitement de pasteurisation subi par le lait dans le deuxième cas réduit considérablement la microflore.

3.1.3.2. Microflore présente dans les fromages

Les résultats des analyses microbiologiques des deux fromages sont présentés dans le tableau XIV. L'évolution de la microflore aux différents stades de la maturation du fromage est variable selon la nature des micro-organismes présents dans deux groupes distincts (figure 31) :

- l'évolution diminue progressivement au cours de l'affinage dans le premier groupe (a), formé par les streptocoques fécaux, les coliformes fécaux et totaux ;
- inversement, la microflore a tendance à augmenter dans le deuxième groupe (b), constitué par la flore mésophile aérobie totale, les streptocoques lactiques, les lactobacilles et les champignons.

Cette évolution est identique dans les deux types de fromages considérés (CA et CI), mais présente néanmoins des différences dans la variation du nombre et de la distribution des microflores.

Tableau XIV: Evolution de la microflore au cours de l'affinage des fromages
Type Camembert (artisanal /industriel) fabriqués

Dénombrement microflore (log ₁₀ UFC/g)	Type de fromage	Jours d'affinage		
		1	6	12
FTAM	Artisanal ^B	7,41 ^b ±0,35	7,33 ^b ±0,18	9,353 ^c ±0,31
	Industriel ^A	4,53 ^a ±0,31	5,89 ^a ±0,499	8,068 ^b ±0,42
Coliformes totaux	Artisanal ^B	2,34 ^b ±0,24	1,756 ^{ab} ±0,269	1,282 ^a ±0,26
	Industriel ^A	1,09 ^{ab} ±0,79	1,426 ^{ab} ±0,38	0,333 ^a ±0,41
Coliformes fécaux	Artisanal ^B	1,607 ^b ±0,082	0,332 ^a ±0,043	0,333 ^a ±0,41
	Industriel ^A	0,418 ^a ±0,2	0 ^a	0 ^a
Streptocoques fécaux	Artisanal ^B	1,326 ^c ±0,2	0,61 ^b ±0,075	0,583 ^b ±0,15
	Industriel ^A	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
Streptocoques lactiques mésophiles	Artisanal ^B	6,7303 ^{bc} ±0,37	6,856 ^{bc} ±0,57	7,539 ^c ±0,35
	Industriel ^A	4,361 ^a ±0,18	5,959 ^b ±0,33	6,977 ^{bc} ±0,480
Lactobacilles mésophiles	Artisanal ^A	4,416 ^a ±0,23	5,286 ^{ab} ±0,19	5,989 ^{bc} ±0,49
	Industriel ^B	5,002 ^{ab} ±0,137	5,568 ^{bc} ±0,27	6,629 ^c ±0,1609
Levures & Moisissures	Artisanal ^B	4,534 ^{ab} ±0,21	5,583 ^{cd} ±0,16	6,106 ^d ±0,33
	Industriel ^A	3,674 ^a ±0,28	4,618 ^{abc} ±0,32	5,463 ^{bcd} ±0,089

Les données dans la même ligne ou colonne pour le même paramètre avec des lettres différentes sont significativement différentes à p< 0,05.

Les coliformes fécaux, disparaissent à partir du 6^{ème} jour d'affinage. Les coliformes totaux, Streptocoques fécaux, diminuent lors de l'affinage dans les deux types de fromages. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette évolution : la concurrence aux substrats, l'augmentation du nombre de certains micro-organismes « utiles » tels les bactéries lactiques ainsi que les levures et des moisissures, les variations physico-chimiques (a_w et pH) et enfin la libération des peptides antibactériens (Richard et Zadi, 1983 ; Richard et Gratadoux, 1984 ; Angela *et al.*, 1996 ; Gobbetti *et al.*, 1997; Fontan *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002; Arenas *et al.*, 2004 ; Kirdar *et al.*, 2018).

Certaines études ont montré que les coliformes diminuent durant la première semaine puis augmentent jusqu'à la fin de l'affinage avec des taux élevés dans le Camembert au lait cru par rapport au lait pasteurisé (Mourgues *et al.*, 1977 ; Rutzinski *et al.*, 1979).

La dominance des espèces bactériennes varie avec le temps d'affinage. Lors de l'affinage du Camembert, la flore acidifiante, représentée par les Lactobacilles et les Streptocoques majoritaires au début d'affinage, régresse en fin d'affinage pour permettre à la flore halotolérante naturelle apportée par le lait (tels que les Microcoques et les *Brevibacterium*) de prendre la relève. Cependant, seuls les Lactocoques, les Entérocoques et les *Leuconostoc* résistent plus longtemps par rapport aux autres espèces qui tendent à disparaître (Dahou *et al.*, 2017).

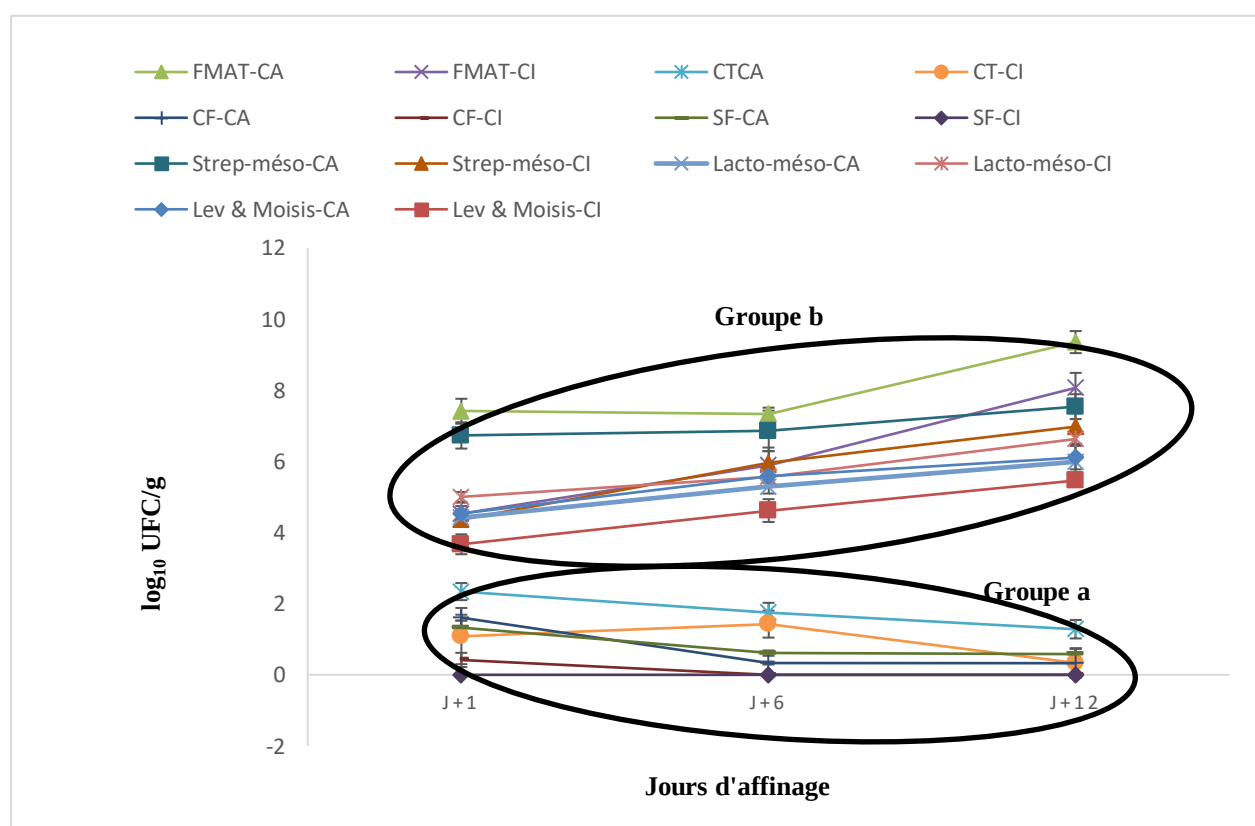


Figure 31 : Evolution des différents groupes microbiens lors de l'affinage des fromages (artisanal / industriel) fabriqués

3.1.4 Etude de l'affinage des fromages par l'analyse en composantes principales

3.1.4.1. Paramètres physico-chimiques

La figure 32 représente les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) des paramètres physico-chimiques sur la qualité des fromages fabriqués au cours de l'affinage.

Les deux premiers axes (F1 et F2) expliquent 91 % de la variation totale. L'axe F1 est lié au gradient temporel de l'affinage et F2 est lié au facteur du type de produit (CA et CI). La projection des moyennes (paramètres physico-chimiques) mensuelles des trois années sur les deux axes (F1 et F2), montre que l'axe F1 sépare parfaitement le fromage au lait cru (CA) de celui obtenu à partir du lait pasteurisé (CI).

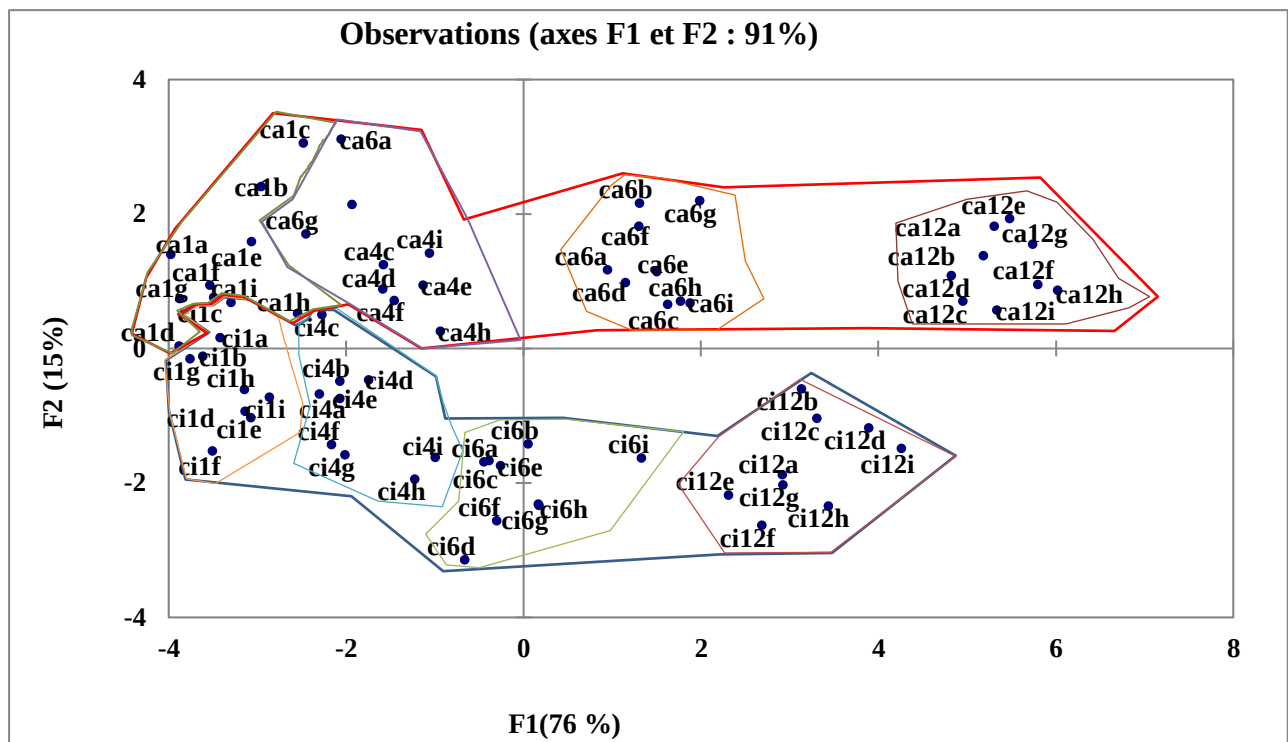


Figure 32 : Résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) des paramètres physico-chimiques sur la qualité des fromages fabriqués (artisanal / industriel) en fonction du stade d'affinage.

Malgré la pasteurisation du lait dans le CI, des similarités dans l'affinage des fromages (CA et CI) persistent durant les quatre premiers jours, mais elles se différencient peu à peu en fonction du temps mis par le fromage dans les hâloirs.

Ainsi, en suivant l'axe du gradient temporel (F1), il en ressort que dans le cas du CA, une évolution des paramètres physico-chimiques est appréciable entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour et qui se poursuit jusqu'au 12^{ème} jour. Pour les mêmes périodes d'affinage, cette évolution est moins importante pour le CI, qui n'est appréciable qu'entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour d'affinage.

Le degré de maturation des fromages est la résultante des facteurs liés aux conditions de production, aux qualités physico-chimiques et microbiologiques du lait cru. Dans ce cadre,

il est intéressant de noter, de par la projection des moyennes des paramètres physico-chimiques annuelles sur le biplot des axes F1 et F2 (Figure 33), que le fromage au lait industriel, malgré qu'il soit plus riche en EST, MG et protéines, possèdent des indices de maturation moins intenses que celui élaboré avec le lait cru. Ce dernier, est plus affiné, avec des indices de maturations (PS%, ANP%, AAL %, AGL%) plus intenses, concentrés au 12^{ème} jour d'affinage.

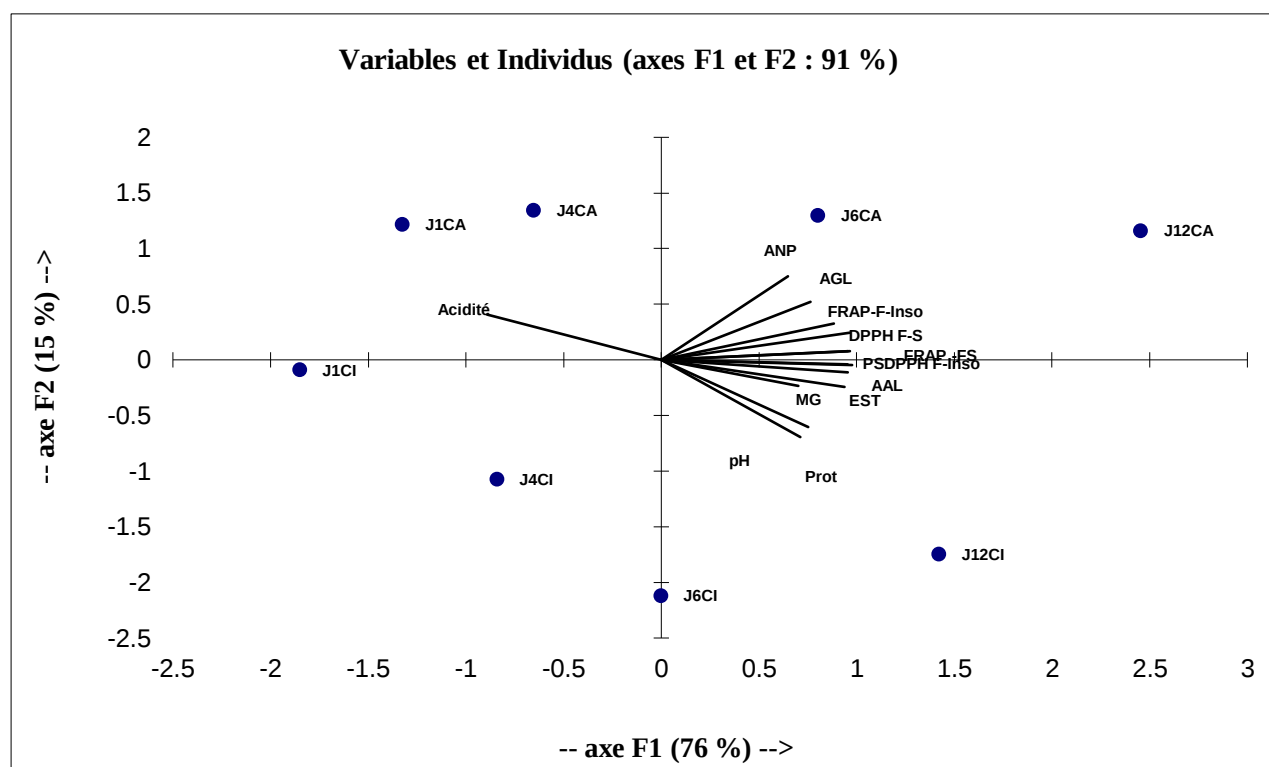


Figure 33: Plan factoriel 1-2 de l'analyse des composants pour les interactions des paramètres physico-chimiques pendant la maturation des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI).

L'évolution physico-chimique au cours de la maturation du CI semble former un gradient en U, en faveur de l'effet Guttman. En effet, cette configuration classique fait que le nuage des modalités se présente, dans les plans factoriels (axes 1 et 2) sous la forme d'une parabole qui est appelée « effet Guttman ». Ce genre de configuration se produit quand précisément il y a des liens multiples entre les paramètres étudiés (Cibois, 1997 ; Flament et Milland, 2003 ; Flament et Milland, 2005).

L'aspect le plus intéressant de cet effet Guttman est au 6^{ème} jour d'affinage du CI, se situant dans le bas de la parabole, dont il représente la durée d'affinage nécessaire au bout de laquelle les paramètres physico-chimiques commencent à évoluer d'une façon très significative. Etant donné que la forme en U de l'effet Guttman n'est pas complète, cela démontre que le CI n'a pas encore atteint sa maturation et qu'il faut prolonger d'avantage sa maturation. Donc, pour la même durée d'affinage, le CA présente un meilleur degré de maturation que le CI.

3.1.4.2. Etude de l'évolution de la microflore d'affinage par ACP

La figure 34, montre les résultats de l'ACP des interactions microbiennes lors de l'affinage des fromages. La quantité des variations expliquées par les deux axes (F1 et F2), représente 94% de la variation totale. Les résultats montrés dans cette figure confirment ceux obtenus par l'analyse de la variance.

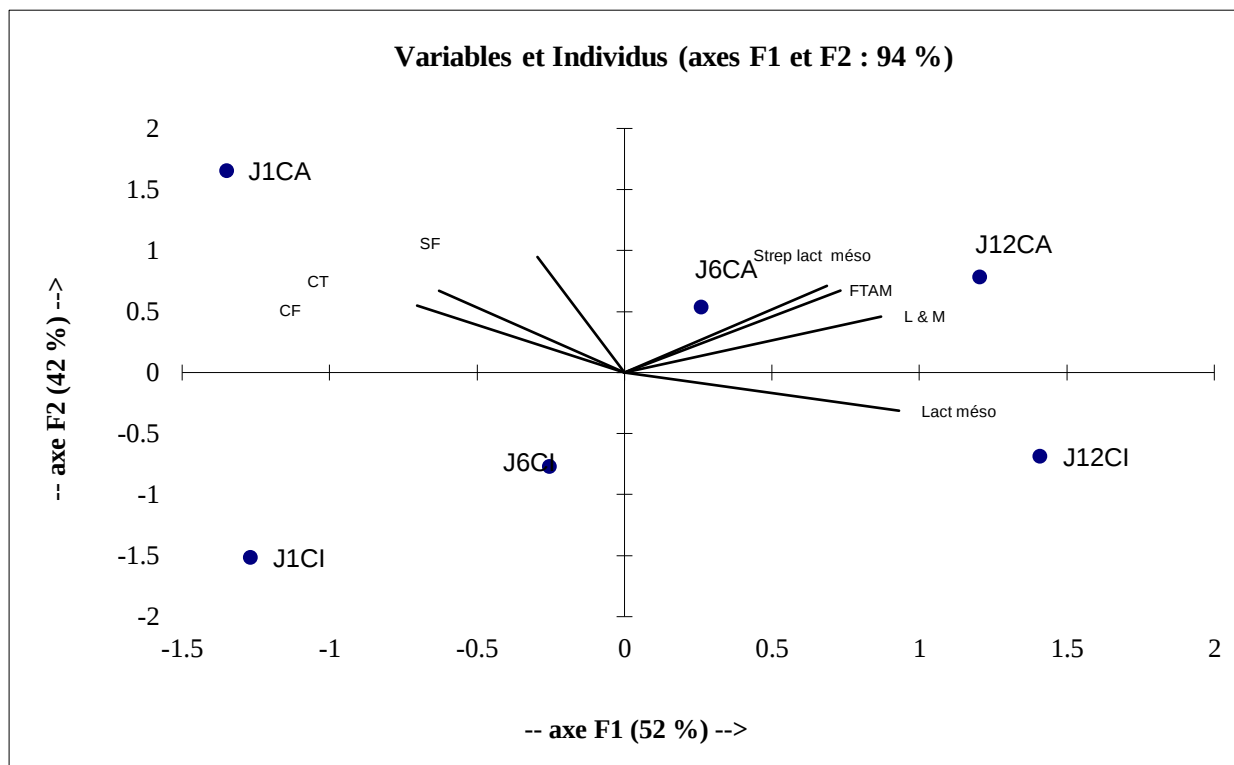


Figure 34 : Plan factoriel 1-2 de l'analyse des composants pour les interactions microbiennes pendant la maturation des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI).

L'ACP des interactions microbiennes met en évidence le groupe des contaminations fécales (Streptocoques fécaux Coliformes totaux et fécaux) qui est très élevé dans le premier jour d'affinage du CA. Alors que le deuxième groupe (flore mésophile aérobie totale, champignons, Streptocoque mésophile) sont en prédominance dans au 12^{ème} jour d'affinage du CA, par contre les Lactobacilles mésophiles se trouvent beaucoup plus dans le CI (12^{ème} jour). Cela explique la tendance observée lors de l'affinage qui s'exprime par la diminution des contaminations lors de la maturation au profit des flores d'affinage.

Le tableau des corrélations (Tableau XV) entre les microflores lors de l'affinage montre des effets négatifs des Lactobacilles et Streptocoques mésophiles sur la croissance des germes de contamination. Il semble que Lactobacilles mésophiles exercent plus d'influence sur la diminution de germes de contamination par rapport aux Streptocoques mésophiles, levures et moisissures, une corrélation significativement négative ($r = -0,87$) avec les coliformes fécaux.

Tableau XV: Tableau de corrélation de Pearson des interactions microbiennes lors de l'affinage des fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI).

	FTAM	CT	C F	SF	Strep méso	Lact méso	L & M
FTAM	1						
CT	-0,04	1					
C F	-0,11	0,64	1				
SF	0,43	0,78	0,76	1			
Strep méso	0,97	0,04	-0,08	0,46	1		
Lact méso	0,49	-0,87	-0,74	-0,56	0,42	1	
L & M	0,93	-0,18	-0,44	0,17	0,91	0,63	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil $\alpha=0,05$ (test bilatéral)

3.1.4.3. Etude de l'interaction par ACP entre les paramètres physico-chimiques et la flore microbienne

Les résultats de l'ACP (figure 35) montrent les interactions qu'il y a entre les paramètres physico-chimiques et microbiologiques lors de la maturation des fromages. Les variations, mises en relief par les deux axes (F1 et F2), représentent 93% de la variation totale.

Les paramètres physico-chimiques évoluent dans le sens opposé des germes de contamination, sauf pour l'acidité titrable. Les micro-organismes se trouvent en grande nombre pendant les premiers jours d'affinage du CA, alors que le reste des germes étudiés évoluent au cours de l'affinage, avec une prédominance dans le CA, sauf pour les lactobacilles. L'axe F2 oppose clairement les coliformes fécaux (CF) et totaux (CT) et les streptocoques fécaux (SF) aux autres germes à savoir : les bactéries lactiques (streptocoques et lactobacilles), FMAT, levures et moisissures.

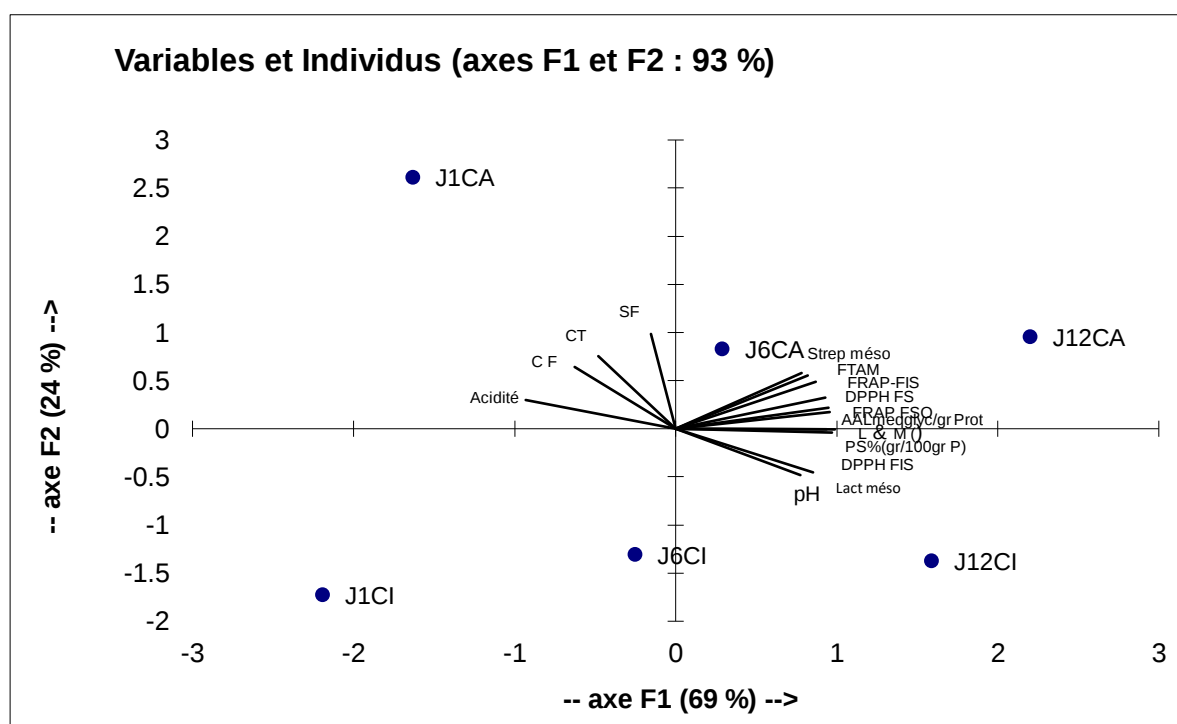


Figure 35 : Plan factoriel 1-2 de l'analyse des composants des interactions physico-chimique et microbiologique lors de l'affinage fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI).

Les résultats de l'ACP, situent en partie le nombre de germes de contamination observés dans le CA, qui ont tendance à disparaître vers la fin de la maturation, à l'inverse des bactéries lactiques qui augmentent au cours de l'affinage. L'effet positif des bactéries lactiques sur la bio-conservation du CA, peut-être dû à l'activité antibactérienne des peptides bioactifs ou aux bactériocines libérées dans le fromage.

Le tableau XVI montre des corrélations complexes entre les paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Il en ressort, que les levures et moisissures ont des corrélations significativement positives ($p < 0,05$) avec les produits de protéolyse (PS, AAL). Les lactobacilles présentent quant à elles des corrélations négatives avec les CT, CF et SF, expliquant ainsi leur effet antagoniste à l'égard des germes de contamination au cours de l'affinage du CA, ce qui est un moyen efficace de préservation de la salubrité des fromages aux laits crus.

Tableau XVI : Résultats des corrélations de Pearson des interactions physico-chimique et microbiologique lors de l'affinage des fromages
type Camembert (artisanal / industriel) fabriqués.

	pH	acidité	PS	AAL	FRAP-F- Inso	FRAP F-S	DPPH P- Inso	DPPH F-S	FTAM	CT	C F	SF	Strep méso	Lact méso	L & M
pH	1														
acidité	0,91	1													
PS	0,69	-0,89	1												
AAL	0,82	-0,89	0,83	1											
FRAP-F- Inso	0,46	-0,66	0,81	0,83	1										
FRAP F- S	0,62	-0,86	0,95	0,86	0,90	1									
DPPH – F-Inso	0,74	-0,93	0,98	0,88	0,85	0,97	1								
DPPH-F- S	0,55	-0,81	0,94	0,86	0,92	0,98	0,95	1							
FTAM	0,35	-0,58	0,80	0,73	0,98	0,87	0,81	0,89	1						
CT	0,67	0,63	-0,57	-0,32	-0,04	-0,32	-0,51	-0,27	-0,04	1					
C F	0,76	0,76	-0,60	-0,69	-0,24	-0,48	-0,59	-0,51	-0,11	0,64	1				
SF	0,59	0,44	-0,18	-0,17	0,35	0,02	-0,15	0,06	0,43	0,78	0,76	1			
Strep méso	0,40	-0,55	0,71	0,76	0,98	0,80	0,75	0,82	0,97	0,04	-0,08	0,46	1		
Lact méso	0,85	-0,90	0,89	0,73	0,52	0,72	0,86	0,69	0,49	-0,87	-0,74	-0,56	0,42	1	
L & M	0,54	-0,74	0,88	0,90	0,97	0,92	0,90	0,96	0,93	-0,18	-0,44	0,17	0,91	0,63	1

3.2. Evaluation de quelques activités biologiques des fractions fromagères

3.2.1. Activité antibactérienne des fractions hydrosolubles fromagères

3.2.1.1. Vérification de l'identité des souches tests

Les résultats d'indentification (Tableaux XVII et XVIII) ainsi que les autres tests évalués par la galerie API 20 E (figure 36 ; tableaux XV et XVII) et le code du profil numérique révélé par le logiciel APIweb soulignent bien la pureté et l'appartenance des deux souches prises comme références : *E. coli* ATCC 2592 et *S. aureus* ATCC 25923.



Figure 36 : Résultats des tests biochimiques d'*E. coli* ATCC 25922 (galerie API20E)

Tableaux XVII : Résultats des tests physiologiques des souches utilisées

Tests	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923
Gram	-	+
Catalase	+	+
Oxydase	-	-
Coagulase	ND	+
ADNase	ND	+

Tableau XVIII : Résultats des tests biochimiques des galeries API 20 E (*E. coli* ATCC 25922)

Tests	O N P G	A D H	L D C	O D C	C I T	H ₂ S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	C L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A	O X Y
Résultats	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Code	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Profil numérique	5			1			4			4			5			5			2		

3.1.2. Activité antibactérienne

Les résultats des tests des activités antibactériennes des surnageants (bruts et neutralisés) sont présentés dans le tableau XIX.

La présence de zones d'inhibition autour des disques imprégnés par les surnageants neutralisés exempts de peroxyde d'hydrogène suggèrent que l'effet antibactérien observé ne peut être dû qu'à la présence de substances antibactériennes, notamment les bactériocines et les peptides bioactifs à activité antibactérienne (Figure 37).

Tableau XIX : Activité antibactérienne des surnageants de fromages fabriqués au lait cru (CA) ou au lait pasteurisé (CI)

Souches	Type de Surnageant	Type de Fromages	Moy des diamètres des zones d'inhibitions (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Brut	CI (F)	10,8 ± 0,972
		CA (O)	10,5 ± 0,989
	Neutralisé	CI (F)	10 ± 1,944
		CA (O)	8,8 ± 0,324
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Brut	CI (F)	11,7 ± 0,216
		CA (O)	11,3 ± 0,216
	Neutralisé	CI (F)	8,2 ± 0,648
		CA (O)	7,9 ± 0,324

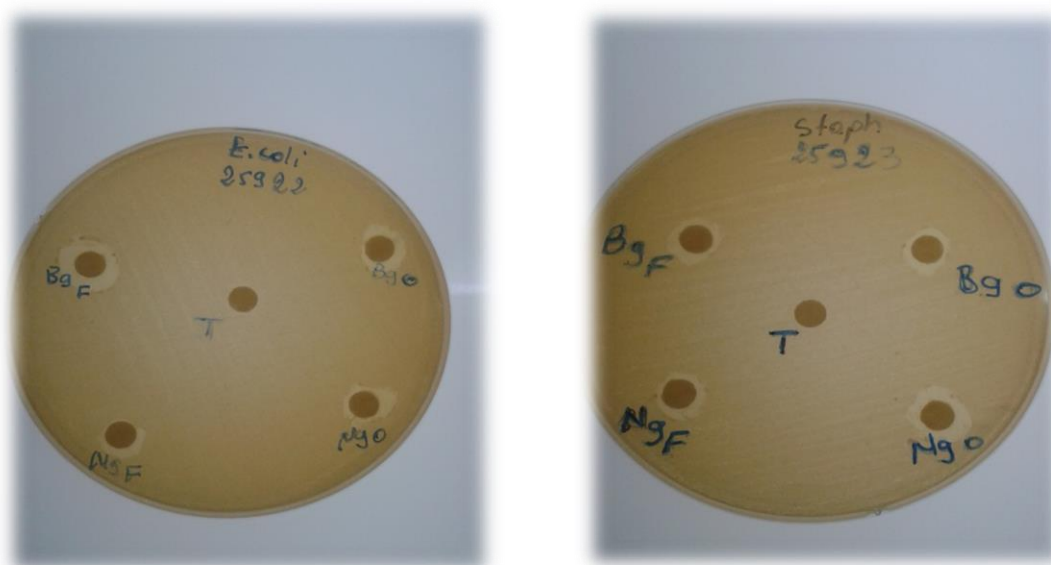


Figure 37 : Tests d'inhibition d'activité microbienne des surnageants sur disques, bruts et neutralisés, des fromages CA (B9O et N9O) et CI (B9F et N9F).
 (T) : témoin ; (B9O) : surnageant brut du CA, (N9O) : surnageant neutralisé du C ;
 (B9F) : surnageant du CI et (N9F) : surnageant neutralisé du CI.

Ces résultats expliquent en grande partie la diminution de la microflore de contamination lors de l'affinage du fromage au lait cru CA et le rôle de la microflore lactique du lait cru dans la bio-préservation du fromage de ce type de fromage par leur activité protéolytique et la production de bactériocines. Bien que certaines protéines et peptides

bioactifs proviennent du lait, la plus grande part a pour origine la protéolyse lors de l'affinage des fromages (Corrêa *et al.*, 2011 ; Pattorn *et al.*, 2012 ; Power *et al.*, 2013).

Effectivement, les résultats de l'antagonisme des surnageants (bruts et neutralisés) du Camembert artisanal (CA), suivie par mesure de l'absorbance, ont montré que, même en milieu liquide, les fractions hydrosolubles du CA inhibent la croissance d'*E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923 (Figure 37 a et b).

Les analyses statistiques (test de Kruskal-Wallis) montrent qu'il y'a des différences significatives sur la croissance des souches cibles en fonction de la nature de l'extrait hydrosoluble (témoin, brut, neutralisé) ($p < 0,05$). Il semble que l'activité antibactérienne du surnageant (brut et neutralisé) exerce plus d'effet sur *E. coli* par rapport à *S. aureus*, car pour les mêmes périodes d'incubations, les pourcentages d'inhibitions enregistrés sont plus élevés chez *E. coli*.

Les résultats montrent que l'inhibition d'*E. coli* par l'extrait brut et celui neutralisé, apparait après quatre heures avec des taux d'inhibition de 50 et 57 %, respectivement avec le surnageant brut et neutralisé. Au bout de 24 heures d'incubation des taux de l'ordre de 80% sont atteints. Par contre, pour *S. aureus*, le taux de 50% d'inhibition est atteint au bout de 12 heures d'incubation et s'élève après entre 76 et 78%, après 24 heures d'incubation.

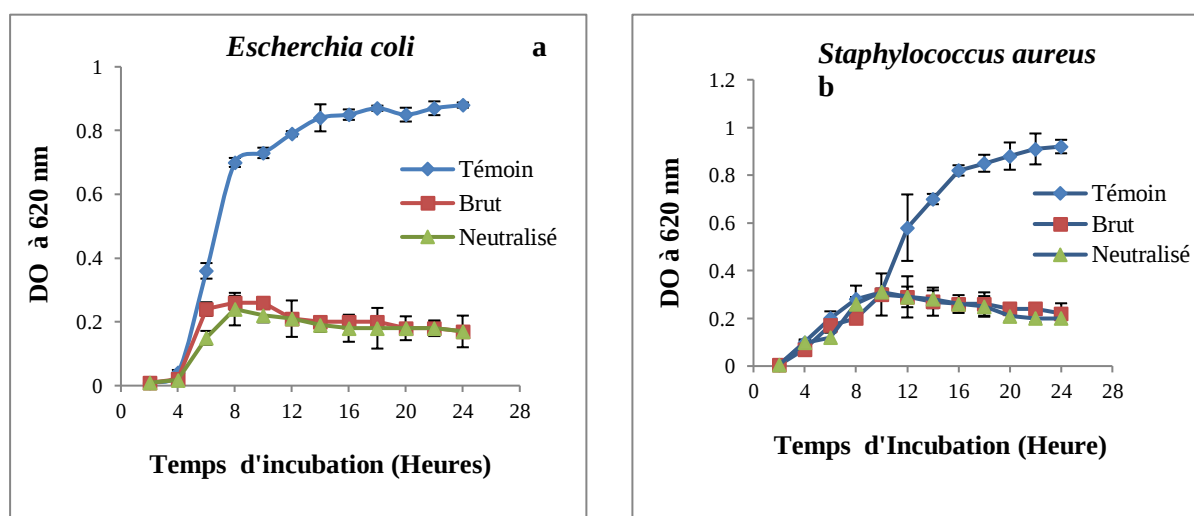


Figure 38 : Courbes de croissance à 37°C d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (a) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(b) en présence des surnageants brut et neutralisé du CA

Cette variation peut être due à la différence dans la composition de la paroi bactérienne, ou à l'effet prometteur des peptides bioactifs par rapport aux bactériocines. Généralement, les bactériocines des bactéries lactiques inhibent des bactéries à Gram positif phylo-génétiquement proches. Cependant, certains travaux ont montré que les bactériocines ont aussi une activité contre les bactéries à Gram négatif telles que *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, etc. (Klaenhammer, 1993 ; Gong *et al.*, 2010 ; Svetoch et Stern, 2010).

Il est établi que les bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne exercée essentiellement par les acides organiques, les bactériocines, le diacétyl et le peroxyde d'hydrogène (Titiek *et al.*, 1996 ; Aslam et Qazi, 2010). De plus, Charlier *et al.* (2009) ont montré que *Lactococcus ssp* et *Leuconostoc ssp* présentent une inhibition à spectre élargi vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

La protection du fromage contre la prolifération des pathogènes peut être assurée par d'autres agents antimicrobiens natifs du lait tels que la lactoferrine (Farnaud et Evans, 2003 ; Wakabayashi *et al.*, 2006), le système lactoperoxydase (LPS) (Seifu *et al.*, 2005) et enfin, le lysozyme (Vincenzetti *et al.*, 2008). Ces agents sont plus ou moins inactivés par le traitement thermique (Claeys *et al.*, 2013). La pasteurisation du lait peut dénaturer partiellement la lactoferrine qui deviendra donc inactive lors de l'affinage (Dupont *et al.*, 2006 ; Conesa *et al.*, 2010).

L'activité de lactoperoxydase dépend du degré du traitement thermique appliqué et qui peut l'inactiver partiellement ou totalement selon les espèces animales (Dumitrașcu *et al.*, 2012 ; Lorenzen *et al.*, 2010).

Les fromages au lait constituent l'habitat naturel des bactéries lactiques qui jouent un grand rôle dans leur bio-conservation par la production de substances antibactériennes, l'appauvrissement des sucres fermentescibles et l'abaissement du pH. Plusieurs auteurs ont montré, *in vitro*, que les bactéries lactiques isolées à partir des fromages artisanaux sont capables d'inhiber les souches pathogènes les plus incriminées dans les fromages par la production de bactériocines notamment contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Dal Bello *et al.*, 2010 ; Diop *et al.*, 2007 ; Ortolani *et al.*, 2010).

Les résultats de l'effet antagoniste des bactériocines sur les bactéries pathogènes n'ont pas toujours d'effets sur l'évolution du fromage, ceci peut être dû selon plusieurs auteurs (Deegan *et al.*, 2006 ; Grattepanche *et al.*, 2007 ; Sobrino- López et Martín-Belloso, 2008) à leurs interactions avec la matrice du fromage (dégradation, adsorption, distribution inégale), microflore native et l'environnement physico-chimique défavorable.

La grande majorité des variétés de fromages connus, contiennent déjà une certaine quantité de kappacines (A et B) sous forme de caseinomacropéptide (CMP), douée d'activité antibactérienne, qui sont libérées suite à l'action d'enzymes coagulantes (présure ou d'autres enzymes coagulantes) sur la κ -caséine (Malkoski *et al.*, 2001 ; Benkerroum, 2010 ; Vajih, 2012).

Dans le cas du Camembert, plusieurs études ont montré l'effet des bactéries lactiques ainsi que leurs produits sur l'inhibition de *Listeria ssp*. L'ajout des cultures productrices de bactériocines en combinaison avec les cultures commerciales ont permis d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* durant l'affinage du Camembert (Maisnier-Patin *et al.*, 1992 ; Wan *et al.*, 1997).

L'addition de nouvelles souches de *Lactobacillus ssp* (LAB 100) à effet antifongique permet de contrôler la sur-maturation du Camembert causée par l'activité protéolytique élevée de *Penicillium camemberti* et d'augmenter sa durée de conservation (Khider et Elbanna, 2017).

Lignitto *et al.* (2012) et Nguyen Thi *et al.* (2014) ont montré que l'inhibition de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* par les extraits hydrosolubles de fromages au lait cru est attribué soit aux peptides ayant un PM <10 kDa ou un PM < 1kDa où deux peptides antibactériens ont été ainsi identifiés : α s1-CN f(1-23) et α s2-CN f(183-207).

L'activité antimicrobienne des extraits hydrosolubles des fromages ne peut être attribuée uniquement aux bactériocines intactes connues qui ont une masse moléculaire supérieure à 3 kDa (Drider *et al.*, 2006). En effet, Pritchard *et al.* (2010), en étudiant l'effet antibactérien et antioxydant des extraits hydrosolubles du fromage, a constaté que les fractions dont le PM > 10 kDa présentaient une meilleure activité inhibitrice à l'égard de *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, alors que les fractions < 5 kDa ont de faibles activités.

L'effet du traitement du lait (pasteurisé ou cru) et l'ajout ou non de *Lactobacillus rhamnosus*, lors de la fabrication du Camembert, ont révélé des profils RP-HPLC d'hydrolyse de caséines où 15 pics ont été identifiés comme potentiellement bioactifs et qui proviennent tous de la β -CN avec la prédominance de fragments antibactériens f(193-209) de la β -CN (Galli *et al.*, 2019).

Notons enfin que plusieurs études ont décrit l'effet négatif des traitements thermiques et l'effet positif de l'ajout de probiotiques sur la protéolyse, la production de peptides bioactifs et l'augmentation des pouvoirs antimicrobiens des fractions hydrosolubles et insolubles, au cours d'affinage de différents types de fromages (Sieber *et al.*, 2010 ; Sahingil *et al.*, 2014 ; Hernandez-Galan *et al.*, 2016 ; Batool *et al.*, 2018 ; Oner et Saridag, 2018 ; Chen *et al.*, 2020).

3.2.2. Activités anti-oxydantes

3.2.2.1. Activité antiradicalaires et pouvoir réducteur des fractions fromagères

Lors de la présente étude, la réaction de DPPH et le pouvoir réducteur (FRAP) ont été choisis pour étudier l'activité antioxydante des fractions hydrosolubles des solutions fromagères aux différents stades d'affinage (Tableau XX).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH obtenu montre que les fromages ont des activités anti-radicalaires plus faibles que celles de la vitamine C. Si l'on prend en considération les résultats des activités antioxydantes des fromages au 12^{ème} jour d'affinage du CA, comme référence à 10 mg/mL (lyophilisat), les équivalents (concentration massique) en vitamine C, pour avoir la même activité antioxydante, sont de 88,09 μ g/mL pour l'activité anti-radicalaire (DPPH) et 76,66 μ g/mL pour le pouvoir de réduction du fer (FRAP).

Le pouvoir antioxydant des fractions hydrosolubles (protéines sériques) et insolubles (caséines) augmentent lors de l'affinage (Figure 39). Néanmoins, le premier (pouvoir antioxydant de la fraction hydrosoluble) est supérieur à celui enregistré pour la fraction insoluble.

Ces résultats montrent aussi que le Camembert artisanal présente significativement, une activité anti-oxydante plus élevée que celle du Camembert industriel. La différence entre l'activité anti-oxydante (DPPH et FRAP) lors de l'affinage des fromages pourrait être attribuée à la microflore microbienne et les enzymes des matrices fromagères, qui affectent le degré d'hydrolyse des caséines en produisant des hydrolysats ayant une composition en acides aminés et peptides différentes.

Tableau XX : Activité antiradicalaire (% inhibition du DPPH) et pouvoir réducteur (FRAP) au cours de l'affinage des fromages (artisanal / industriel) fabriqués.

Activité antioxydante	Fractions	Types de fromage	Jour d'affinage			
			1	4	6	12
FRAP (DO _{700 nm})	Insoluble	Artisanal ^A	0,029 ^a ± 0,04	0,032 ^a ± 0,0048	0,034 ^{ab} ± 0,0087	0,042 ^{ab} ± 0,003
		Industriel ^A	0,014 ^a ± 0,003	0,023 ^a ± 0,008	0,025 ^b ± 0,014	0,034 ^{ab} ± 0,012
	Soluble	Artisanal ^B	0,062 ^{ab} ± 0,002	0,059 ^a ± 0,0079	0,073 ^{cd} ± 0,0026	0,092 ^e ± 0,002
		Industriel ^A	0,06 ^a ± 0,0026	0,065 ^{ab} ± 0,0068	0,069 ^{bc} ± 0,0036	0,079 ^d ± 0,009
DPPH (%inhibition)	Insoluble	Artisanal ^B	3,16 ^{ab} ± 0,21	3,66 ^{abc} ± 0,29	4,26 ^c ± 0,13	6,27 ^d ± 0,45
		Industriel ^A	2,86 ^a ± 0,32	3,35 ^{ab} ± 0,35	4,04 ^{bc} ± 1,41	5,6 ^d ± 0,68
	Soluble	Artisanal ^B	15,57 ^{abc} ± 0,95	17,94 ^c ± 0,87	21,77 ^d ± 1,41	28,71 ^e ± 2,42
		Industriel ^A	13,17 ^a ± 1,16	14,82 ^{ab} ± 1,19	16,91 ^{bc} ± 1,14	22,43 ^d ± 3,12

Les données dans la même ligne ou colonne pour un paramètre donné, ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$

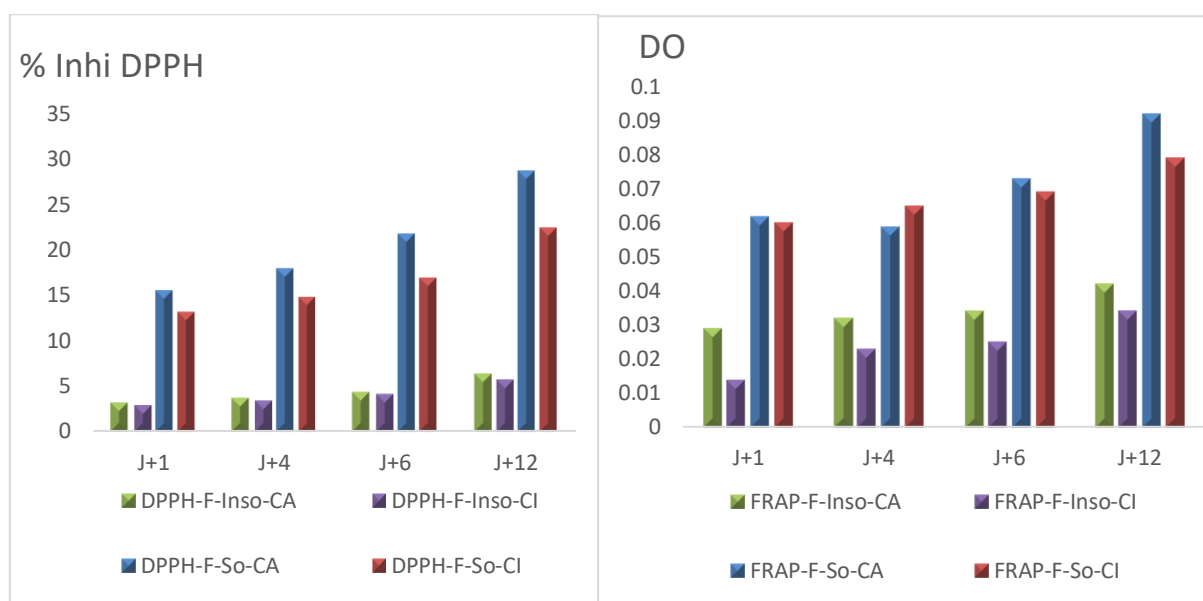


Figure 39: Evolution des activités anti-oxydantes des fractions solubles et insolubles lors de l'affinage des fromages type Camembert (artisanal / industriel) fabriqués

3.2.2.2. Corrélation entre les produits d'hydrolyse et les activités anti-oxydantes

Le tableau (XXI) montre bien que l'activité antioxydante des fromages se développent lors de la maturation avec la même tendance que les produits de la protéolyse (PS%, ANP% et ALL) où il est permis de relever des corrélations positives entre les produits de protéolyse (PS, ANP et AAL) et les activités antioxydantes (DPPH et FRAP), mesurées dans les fractions solubles et insolubles des fromages (CA et CI).

Tableau XXI : Corrélations entre les produits de la protéolyse (PS, ANP, AAL) et les activités antioxydantes (DPPH, FRAP) des fractions solubles et insolubles des fromages (CA et CI)

	pH	acidité	EST	MG	PROT	PS	ANP	AGL	AAL	FRAP- F-Inso	FRAP F-S	DPPH F-Ins	DPPH F-S
pH	1												
acidité	-0,91	1											
EST	0,85	-0,92	1										
MG	0,67	-0,67	0,66	1									
PROT	0,94	-0,92	0,88	0,61	1								
PS	0,62	-0,83	0,87	0,51	0,67	1							
ANP	-0,05	-0,25	0,44	0,32	0,04	0,66	1						
AGL	0,18	-0,50	0,63	0,38	0,32	0,72	0,89	1					
AAL	0,78	-0,87	0,96	0,78	0,77	0,85	0,56	0,69	1				
FRAP-F-Inso	0,40	-0,63	0,70	0,74	0,41	0,83	0,83	0,77	0,83	1			
FRAP F-S	0,63	-0,85	0,85	0,61	0,64	0,97	0,66	0,74	0,88	0,88	1		
DPPH F-Ins	0,71	-0,91	0,89	0,64	0,74	0,97	0,58	0,68	0,90	0,85	0,97	1	
DPPH F-S	0,51	-0,77	0,83	0,58	0,57	0,96	0,80	0,85	0,88	0,92	0,97	0,95	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil $\alpha=0,05$ (test bilatéral)

Il est établi que les peptides bioactifs à effet antioxydant des produits laitiers et des fromages, dérivent principalement de l'hydrolyse des caséines par des enzymes natives du lait, de la présure, des ferments lactiques et de bactéries lactiques de type NSLAB (Sieber *et al.*, 2010 ; Pattorn et Hongsprabhas, 2013 ; Sahingil *et al.*, 2014 ; Mushtaq, 2016).

L'effet des peptides est lié à de nombreux facteurs tels que le type de lait, le traitement thermique, les conditions de maturation, le stade de maturation et le type de fromage (Gagnaire *et al.*, 2011; Pritchard *et al.*, 2010 ; Sforza *et al.*, 2012 ; Korhonen et Marnila, 2013). Klompong *et al.* (2007) ont également signalé que le degré d'hydrolyse et les enzymes utilisées pour la protéolyse jouent un rôle essentiel dans la détermination du pouvoir réducteur des hydrolysats de protéines.

Wu *et al.* (2003) ont indiqué que les différences dans l'activité antioxydante des hydrolysats de protéines pouvaient être attribuées à la composition spécifique (peptide/acide aminé). Ainsi, plusieurs auteurs ont rapporté que les peptides contenant des résidus d'acides aminés tels que Asp, Pro, Trp, Tyr, Met, Cys, Leu, Arg, Ala et His, ont les activités antioxydantes plus élevées (Sarmadi et Ismail, 2010 ; Li *et al.*, 2011 ; Ji *et al.*, 2014). Les acides aminés peuvent agir principalement soit en réduisant le groupement sulfhydryle (cystéine et méthionine) ou en cédant le proton des résidus aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) aux radicaux libres déficients en électrons.

De nombreuses études ont suggéré que les peptides de plus petite taille, libérés par les enzymes protéolytiques, présentaient un meilleur pouvoir réducteur que les fractions de haut poids moléculaire (Pihlanto, 2006 ; Bougatef *et al.*, 2009 ; Ajibola *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2016b).

Un peptide C-terminal de α 1-caséine bovine (f179-199), doté d'activité de piégeage des radicaux libres, a été séparé du lait fermenté par *Lactococcus lactis* SL6 (KCTC 11865BP) (Sang *et al.*, 2017). Le lait fermenté avec *Lactobacillus jensenii* a un potentiel antioxydant avec des teneurs élevées en acides aminés libres hydrophobes (valine, leucine,

phénylalanine et tryptophane), tandis que celui obtenu avec *Lactococcus lactis*, avait une concentration beaucoup plus faible en acides aminés libres et contenait seulement l'histidine, connue pour son pouvoir antioxydant (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2005).

Il a été également rapporté que les caséines intactes possèdent elles-aussi une activité antioxydante (Power *et al.*, 2013). Cependant, la digestion enzymatique, *in vitro* des caséines, libère de petits peptides avec une activité de piégeage radicalaire du DPPH élevée par rapport aux caséines natives (Suetsuna *et al.*, 2000).

Barac *et al.* (2016 a,b) ont montré que l'activité antioxydante dans les fromages blanc Serbe (de vache et de chèvre) augmente au cours de l'affinage. Cette dernière serait attribuée plus aux fractions hydrosolubles de ces fromages.

Des résultats similaires ont été observés lors de l'affinage du fromage Cheddar par Gupta *et al.* (2009), qui ont constaté que les changements dans l'activité antioxydante étaient liés à la protéolyse, elle-même dépendante du stade d'affinage et du type de ferments utilisés (avec ou sans adjonction de probiotique).

Les propriétés antioxydantes des protéines sont également liées à leur hydrophobicité, ainsi qu'à leur pouvoir chélateur des métaux (Diaz *et al.*, 2003 ; Elias *et al.*, 2008 ; Farvin *et al.*, 2010). De plus, la superoxyde dismutase et la peroxydase du lait sont des enzymes antioxydantes, quicatalysent la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et la conversion de ce dernier en eau (Valko *et al.*, 2007).

Concernant les fromages traditionnels ou ceux fabriqués au lait cru, il a été constaté au cours de l'affinage du Cotija, fromage artisanal mexicain au lait cru et à pâte dure, que l'activité antioxydante (DPPH) et le pouvoir inhibiteur de l'ECA, augmentent pendant la maturation au même titre que les teneurs des fromages en fractions ASN et NPN (Hernandez-Galan *et al.*, 2016).

Oner et Saridag (2018) ont montré qu'au cours de l'affinage du fromage Turque à pâte demi dure (Kashar), que le pouvoir antioxydant coïncide avec l'augmentation des concentrations d'ANP% et d'acide aminé libres et les nombres de profils en RP-HPLC. Lors de l'affinage du Cheddar, le pourcentage d'inhibition de DPPH, dans les fractions hydrosolubles, passe de 9,61 à 44,56%, respectivement pour le 1^{er} et le 120^{ème} jour d'affinage (Batoool *et al.*, 2018).

L'effet du traitement thermique et l'adjonction ou non de *Lactobacillus rhamnosus* GG sur la libération des peptides bioactifs lors de l'affinage du Camembert (au lait cru ou pasteurisé) a révélé un profil protéolytique complexe avec une prédominance de la fraction β -CN f(193-209) douée d'activité antibactérienne et antioxydante très élevée dans le Camembert au lait cru (Galli *et al.*, 2019).

Globalement, l'activité antioxydante du fromage est tributaire du degré de protéolyse, du type de fromage et les conditions de maturation utilisées (Gouldsworthy *et al.*, 1996 ; Haileselassie *et al.*, 1998 ; Saito *et al.*, 2000 ; Ryhanen *et al.*, 2001; Ong *et al.*, 2007). De plus, la microflore du lait et l'ajout de souches probiotiques avec ou sans ferments conventionnels lors de la fabrication augmentent considérablement leur pouvoirs antioxydants (Kudoh *et al.*, 2001 ; Virtanen *et al.*, 2007).

Conclusion

Conclusion

Ce travail a été réalisé sur deux types de fromages à pâtes molles type Camembert, fabriqués au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou : l'un industriel (CI) a été produit à partir du lait pasteurisé, au niveau d'une fromagerie située à Draa ben Khedda, alors que le second, de type artisanal (CA) est élaboré par une exploitation familiale dans la région des Ouacifs exclusivement à partir du lait cru.

Nous avons voulu savoir, en ciblant l'évaluation de la phase d'affinage de ces produits, qui est l'étape principale de maturation des fromages, dans quelle proportion le Camembert au lait cru pourrait être une alternative intéressante dans le cas de notre réalité nationale, même si ses exigences, notamment hygiéniques, constituent un sérieux rempart à son développement ?

Pour cela, 27 échantillons de laits (cru et pasteurisé) et 108 échantillons de fromages (issus de ces matières premières) ont été utilisés. Les résultats physico-chimiques des laits, réalisés par Lacto-scan, se situent dans les fourchettes tolérées, mais sont significativement différents ($p < 0,05$) selon l'origine du lait. Le lait cru possède des teneurs en protéines et matières sèches plus élevées (respectivement 29,45 g/L et 122.1 g/L), contre (26,66 g/L et 108,13 g/L) pour le lait pasteurisé. Quant aux analyses microbiologiques des laits elles sont conformes globalement à la réglementation en vigueur avec absence de Streptocoques fécaux, de Salmonelles et de Staphylocoques.

L'évolution physico-chimique et microbiologique au cours de l'affinage a été suivie sur une période de 12 jours, en conformité avec ce qui se pratique au niveau national. Le Camembert industriel a présenté des teneurs en matières grasses et en protéines plus élevées (28,75 et 17,20%, respectivement) par rapport au camembert artisanal (25,99 et 15,24%), avec une tendance à la neutralisation des fromages qui se traduit par l'élévation du pH et la diminution de l'acidité titrable (acide lactique %).

Les analyses ont mis en relief aussi le niveau d'affinage avancé du Camembert au lait cru, qui est matérialisé par les niveaux de lipolyse (AGL) et de protéolyse. Concernant la lipolyse, les valeurs obtenues sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celles données par le fromage au lait pasteurisé (3,19 et 1,407 équivalent acide oléique/100g de MG, respectivement pour CA et CI). Alors que les indices protéolytiques de maturation (pourcentages de protéines soluble et d'azote non protéique) évoluent de façon significative ($p < 0,05$) entre le premier et le 12^{ème} jour d'affinage avec des taux plus élevés dans le cas du Camembert artisanal. Au 12^{ème} jour d'affinage, le pourcentage de protéines solubles (PS%) atteint des taux de 22,24 et 17,44% (respectivement, pour CA et CI). Pour un même stade d'affinage, le pourcentage d'azote non protéique (ANP%) est estimé à 0,44 et 0,28 %, respectivement pour CA et CI.

La protéolyse des caséines a été également suivie par électrophorèse (PAGE-SDS). Les profils ont montré l'apparition de fragments de protéolyse plus accentués dans le cas du Camembert artisanal. Cette observation a été confortée par les profils chromatographiques réalisés sur une colonne C8 de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC), en plus du dosage direct (mEq gly/g PT), qui atteint, au 12^{ème} jour d'affinage, les valeurs de 0,25 et 0,23 mEq gly/g PT, respectivement pour le camembert artisanal et industriel.

L'évolution de la microflore microbienne lors de l'affinage des fromages montre une relation inversement proportionnelle entre deux groupes microbiens : le premier, est formé par les streptocoques fécaux et les coliformes (fécaux et totaux), qui diminuent au cours de l'affinage ; le deuxième, est constitué par la microflore mésophile aérobie totale, les streptocoques et lactobacilles mésophiles, levures et moisissures, qui augmentent lors de l'affinage. L'évolution des deux groupes est similaire dans les deux fromages. Néanmoins, ils présentent des différences significatives ($p < 0,05$) en fonction du stade et du type de fromage.

Comme la diminution des germes de contamination pourrait être attribuée à une éventuelle présence de substance antimicrobienne libérée dans la matrice du fromage lors de sa maturation, nous avons essayé de mettre en évidence cette activité aux niveaux des fractions hydrosolubles (bruts et neutralisés) des fromages au 12^{ème} jour d'affinage, à l'égard d'*Escherichia coli* ATCC 2523 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ces essais ont montré que les zones d'inhibition des fractions brutes sont respectivement, de 10,08 (CI) et 10,5 mm (CA) pour *S. aureus* ATCC25923, contre 11,7(CI) et 11,3 mm(CA) pour *E. coli* ATCC 25922. Tandis que les extraits hydrosolubles neutralisés et exemptes de catalase ont montré respectivement des diamètres d'inhibition de l'ordre de : 10 (CI) et 8,8 mm (CA) pour *S. aureus* ATCC25923, et 8,2 (CI) et 7,9 mm (CA) pour *E. coli* ATCC 25922.

Les fractions hydrosolubles (brutes et neutralisées) extraites à partir du CA, ont été exploitées également, pour étudier le pouvoir antibactérien des fractions hydrosolubles du CA, en milieu liquide, par le suivi de la cinétique de croissance des mêmes souches cibles et par la mesure de la densité optique à 620 nm. Les résultats ont montré que 50% d'inhibition de *S. aureus* sont atteints après 12 heures d'incubation avec la fraction hydrosoluble brute ou neutralisée. Ce même taux est atteint uniquement après quatre heures d'incubation d'*E. coli* avec les mêmes fractions. Ces résultats sont en corrélation avec ceux du test de disques, dont *E. coli* a été plus sensible que *S. aureus* envers les substances antibactériennes des extraits hydrosolubles du CA.

En plus du pouvoir antimicrobien des peptides bioactifs, l'activité antioxydante développée par les fromages au cours de l'affinage a été mesurée par les tests de DPPH et FRAP. Le pouvoir antioxydant (DPPH et FRAP) des fractions hydrosolubles (protéines sériques) et insolubles (caséines) augmentent lors de l'affinage avec des différences significatives ($p < 0,05$) en fonction du stade et du type de fromage. Le pouvoir antioxydant des fractions solubles est significativement supérieur à celui des fractions insolubles.

Au 12^{ème} jour d'affinage, le pourcentage d'inhibition de DPPH se situe respectivement à 28,71(CA) et 22,43% (CI) dans les fractions solubles, et à 6,27% (CA) et 5,6% (CI) dans les fractions insolubles. Quant au pouvoir réducteur du fer(FRAP), les valeurs des densités optiques mesurées à 700nm, au 12^{ème} jour d'affinage, étaient de 0,042 (CA)et 0,034 (CI), et de 0,092 (CA) et 0,079 (CI), respectivement pour fractions insoluble et soluble.

L'évolution physico-chimique, microbiologique et le pouvoir antioxydant lors de la maturation des fromages ont été mis en valeur également par l'analyse en composantes principales (ACP). Les résultats montrent clairement une différence lors de l'affinage des camemberts avec une prévalence en MS, MG et protéines (%) et en Lactobacilles mésophiles dans le cas du fromage industriel, alors que le fromage au lait cru est plus riche en germes de

contamination au premier jour d'affinage. Il présente aussi une plus grande concentration des indices de protéolyse, de lipolyse, DPPH, FRAP ainsi que la microflore affinage (FMAT, Streptocoques lactiques mésophiles, levures et moisissures). Ce qui se répercute positivement sur le niveau d'affinage plus élevé de ce type de fromage, en comparaison de celui élaboré au niveau industriel à partir du lait pasteurisé.

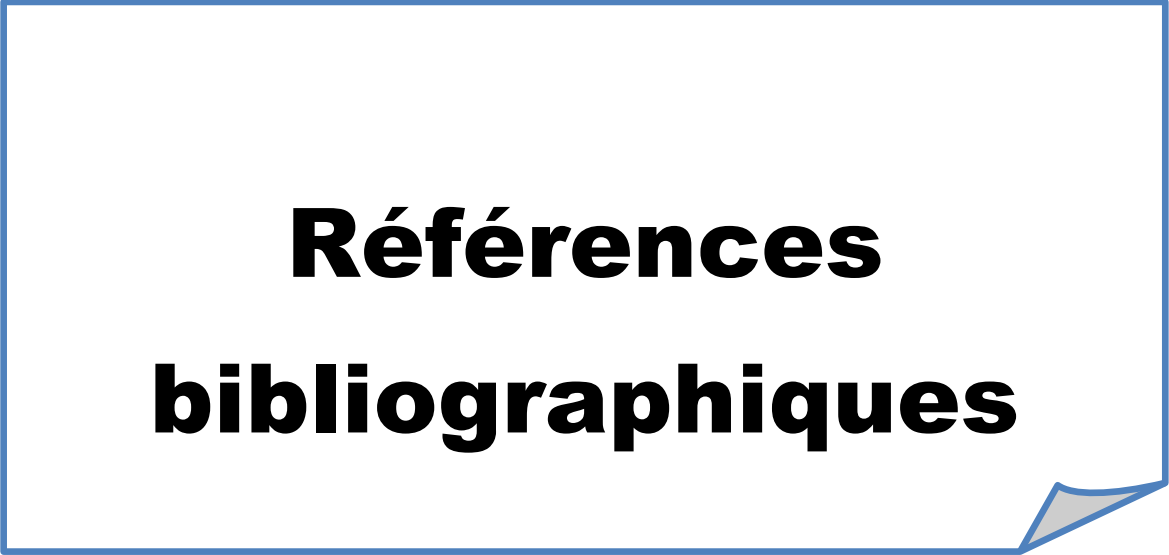
Ces investigations ont permis de donner un aperçu aussi fiable que possible sur quelques aspects de la qualité de deux types de fromages fabriqués et commercialisés au niveau local. Malgré les risques qu'il présente au niveau hygiénique, cette étude a montré que le camembert au lait cru, qui présente une salubrité et un degré d'affinage nettement plus relevé, pourrait être une alternative intéressante dans notre tissu industriel, pour peu que le savoir-faire local et le respect des bonnes pratiques d'hygiène qui entourent cette fabrication soient de mise.

En plus de la possibilité de créer des postes d'emploi, cette perspective pourrait juguler un tant soit peu la demande croissante en importation de poudres de lait, parallèlement à l'encouragement de la production de lait. Cette orientation, s'il venait à être retenu, nécessite l'accompagnement des éleveurs, comme principaux acteurs de la filière lait, par une couverture sanitaire appropriée et la mise en place d'un plan de développement durable dans les zones rurales, souvent démunies qui apporterait une prospérité et stabilité aux agriculteurs-éleveurs et fournirait sur le marché des produits laitiers de bien meilleures qualités.

Nous avons ciblé certains paramètres d'évaluation de la qualité des produits dérivés en tenant compte des moyens dont nous disposons et des difficultés de mener une telle étude « in situ » sur les lieux de fabrications, sachant que ces unités ne disposent pas malheureusement de halls technologiques appropriés pour faire des essais à petite échelle.

Néanmoins, nous comptons poursuivre et approfondir ces aspects en prenant en charge, sous une forme ou une autre, les éléments complémentaires que nécessitent une telle étude :

- prolonger le temps d'affinage à plus de 12 jours et voir ce que cela donnerait en terme de maturation ;
- évaluer en profondeur les aspects nutritionnels en dosant comparativement les nutriments de base, vitamines...etc, mais aussi les produits de la réaction de Maillard (furosine et Hydroxy méthyl furfural, notamment) dans le cas des fromages au lait (cru/ lait recombinaé pasteurisé / lait frais local pasteurisé) ;
- screener d'avantage la maturation en distinguant entre la couche supérieure du fromage et celle en profondeur ;
- réaliser un test de dégustation en fin de production approprié avec un pannel d'initiés et selon des règles bien établies ;
- doser certains métabolites de l'affinage par les techniques de hautes performances appropriées (CPG et HPLC), si possible couplées à la spectrométrie de masse pour pouvoir identifier les métabolites marqueurs de l'affinage.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbas K. (2012).** Effet de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels : le cas des pâtes persillées. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, France.
- Abidi K. (2004).** Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson. Thèse de Médecine Vétérinaire, École Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie.
- Addeo F., Pélissier J.P. & Chianese L. (1980).** Specific action of milk clotting enzymes on water buffalo caseins. I. Effect of chymosin on β -casein. *Journal of Dairy Research*, 47, 421-426.
- Adjoudj F., Guessas B., Spano G., Capozzi V. & Kihal M. (2020).** Phenotypic and genotypic characterization of *Lactobacilli* and *Pediococci* isolated from traditional Algerian fermentation products. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 10 (2), 95-103.
- AFNOR (Association Française de Normalisation) (1980).** Lait. Détermination de la matière sèche. Recueil de normes françaises. Laits et Produits Laitiers. AFNOR: NF V04 207.
- Ajibola C.F., Fashakin J.B., Fagbemi T.N. & Aluko R.E. (2011).** Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6685-6702.
- Alais C. & Linden G. (1997).** Abrégé de Biochimie Alimentaire. 4^{ème}ed., Masson, Paris.
- Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D. & Kuipers O.P. (2016).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2939-2951.
- Angela C., Macedo M., Costa L. & Xavier Malcata F. (1996).** Changes in the Major Free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *International Dairy Journal*, 6, 79-94.
- Arenas R., González L., Bernardo A., Fresno J.M. & Tornadijo M.E. (2004).** Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, 15 (4), 271-279.
- Aslam S. & Qazi J.I. (2010).** Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(5), 567-573.
- Atlan D., Aubel D. & Gilbrt C. (2000).** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases de surface. *Sciences des Aliments*, 230 (1), 5-17.
- Aworth O.C. & Muller HG. (1987).** Cheesemaking properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chemistry*, 26, 71-79.
- Barac M., Smiljanic M., Žilic S., Pesic M., Stanojevic S., Vasic M., Vucic T. & Kostic A. (2016a).** Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and insoluble protein fractions of white cow cheese at different stage of ripening. *Mljekarstvo*, 66, 187-197.
- Barac M., Smiljanic M., Zilic S., Pesic M. Stanojevic S., Vasic M., Vucic T., Kostic A. (2016b).** Protein profiles and total antioxidant capacity of water-soluble and water-insoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1140-1149.

- Barbé F., Le Feunteun S., Rémond D., Ménard O., Jardin J., Henry G., Laroche B., Dupont D. (2014).** Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Research International*, 63, 147-156.
- Baribo L.B. & Foster E.M. (1952).** The intracellular proteinases of certain organisms from cheese and their relationship to the proteinases in cheese. *Journal of Dairy Science*, 35 (2), 149-155.
- Bastian S.E.P., Collins C. & Johnson T.E. (2010).** Understanding consumer preferences for Shiraz wine and cheddar cheese pairings. *Food Quality and Preference*, 21(7), 668-678.
- Batool M., Nadeem M., Imran M., Taj Khan I., Bhatti J.A. & Ayaz M. (2018).** Lipolysis and antioxidant properties of cow and buffalo cheddar cheese in accelerated ripening. *Lipids in Health and Disease*, 17 (1), 1-10.
- Bekhouche-Guendouz N. (2011).** Evaluation de la durabilité des exploitations bovines laitières des bassins de la Mitidja et d'Annaba. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger, Algérie.
- Bencharif A. (2001).** Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: états des lieux et problématiques ; in : «Les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée : état des lieux, problématique et méthodologie pour la recherche (Padilla M., Ben Saïd T., Hassainya J. & Le Grusse P.)». CIHEAM, Montpellier, France.
- Benfeldt C., Rensen S., Ellegard K.H. & Petersen T.E. (1997).** Heat treatment of cheese milk; effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 7, 723-731.
- Benfeldt C. & Sørensen J. (2001).** Heat treatment of cheese milk: Effect on proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 567-574.
- Benfeldt C. (2006).** Ultrafiltration of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16(6), 600-608.
- Benkerroum N. (2010).** Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 320-338.
- Bennett R.J. & Johnston K.A. (2004).** General Aspects of Cheese Technology; in: «Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (FOX P.F., MCSWEENEY P.L.M., COGAN T.M. & TIMOTHY P.) ». Academic Press, London.
- Benyagoub E. & Mohammed A. (2014).** Hazard analysis and testing for implemented a HACCP system at a dairy factory in South West Algeria. *Food Science and Quality Management*, 32, 57-66.
- Berdague J.L., Grappin R., Chaillet B., Clément J.F., Duboz G. & Pidoux P. (1990).** Caractérisation de l'emmental français "grand-cru". II. Analyses sensorielles. *Le Lait*, 70, 133-145.
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L. & Cogan T.M. (2001).** Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Berard L. & Marchenay P. (2007).** Produits de terroir - Comprendre et agir ; Ressources des Terroirs - Cultures, Usages, Sociétés. CNRS, France.

- Bertolino M., Dolci P., Giordano M., Rolle L. & Zeppa G. (2011).** Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry*, 129, 1001-1011.
- Bertuzzi A.S., McSweeney P.L. H., Rea M.C. & Kilcawley K.N. (2018).** Detection of volatile compounds of cheese and their contribution to the flavor profile of surface-ripened cheese. *Food Science and Food Safety*, 17(2), 371-390.
- Bessaoud O., Pellissier J.P., Rolland J.P. & Khechimi W. (2019).** Rapport de synthèse sur l'Agriculture en Algérie. (Rapport de recherche). *CIHEAM-IAMM*, pp.82.
- Bhat Z.F., Kumar S. & Bhat H.F. (2015).** Bioactive peptides of animal origin: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 59(9), 5377-5392.
- Birkemo G.A., O'sullivan O., Ross R.P. & Hill C. (2009).** Antimicrobial activity of two peptides caseicin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 233-240.
- Blaya J., Barzideh Z. & LaPointe G. (2017).** Interaction of starter cultures and non starterlactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, 101, 1-19.
- Bocquier F., Ligios S., Molle G. & Casu S. (1997).** Effets de la photopériode sur la production, la composition du lait et sur les consommations volontaires chez la brebis laitière. *Annales de Zootechnie*, 46, 427-438.
- Bontinis T.G., Mallatou H., Pappa E.C., Massouras T. & Ali-Chanidis E. (2012).** Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*, 105, 193-201.
- Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y. & Nasri M. (2009).** Antioxidant and free radicalscavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.
- Bourry A., Poutrel B. & Rocourt J. (1995).** Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: Characteristics of natural and experimental infections. *Journal of Medical Microbiology*, 43(2), 125-132.
- Bouton Y., Guyot P., Dasen A. & Grappin R. (1993).** Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté : I. Validation sur mini fromages des techniques de laboratoire. *Le Lait*, 73, 265-279.
- Bouton Y., Guyot P., Dasen A. & Grappin R. (1994).** Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté : II. Application en sites industriels. *Le Lait*, 74, 33-46.
- Boutrou R., Gaucheron F., Piot M., Michel F., Maubois J-L. & Léonil J. (1999).** Changes in the composition of juice expressed from Camembert cheese during ripening. *Le Lait*, 79, 503-513.
- Boutrou R., Molle D. & Leonil J. (2001).** Action of the lactococcal proteinase during Camembert-type curd making. *International Dairy Journal*, 11, 347-354.
- Bove C.G., Angelis M. D., Gatti M., Calasso M., Neviani E. & Gobbetti M. (2012).** Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *Proteomics*, 12, 3206-3218.

- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. & Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28, 25-30.
- Brogden K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238-250.
- Brulé G., Maubois J.L & Fauquant J. (1974).** Etude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane. *Le Lait*, 54, 600-615.
- Brulé G., Lenoir J. & Remeuf F. (1997).** Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage Chapitre 1 : La micelle de caséine et la coagulation du lait ; in : « Le fromage (ECK A. et GILLIS J.C.) ». Tec et Doc, Lavoisier. Paris, France.
- Buffa M.N., Trujillo A.J., Pavia M. & Guamis B. (2001).** Changes in textural, microstructural, and color characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats milk. *International Dairy Journal*, 11, 927-934.
- Buyong N., Kok J. & Luchansky J.B. (1998).** Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis subsp. lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4842-4845.
- Cao-Hoang L., Grégoire L., Chainé A. & Waché Y. (2010).** Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of *Listeria* development with nisin-incorporated sodium caseinate films. *Food Control*, 21, 1227-1233.
- Charles C. & Ribadeau-Dumas B. (1984).** Kinetics of action of chymosin (rennin) on some peptide bonds of bovine β -casein. *Biochemistry*, 23, 6839-6843.
- Carlson A.C., Hill G., Norm J. & Olson F. (1987).** Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 582-589.
- Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suarez V. & Reinheimer J. (2010).** Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations; in: « Biotechnology of Lactic Acid Bacteria (MOZZI F., RAYA R. & VIGNOLA G.) ». LOAWA, USA.
- Caro I., Mateo J., Sandoval M.H., Soto S., García-Armesto M.R. & Castro J.M. (2013).** Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3461-3470,
- Caroli A., Rizzi R., Lühken G. & Erhardt G. (2010).** Short communication: Milk protein genetic variation and casein haplotype structure in the Original Pinzgauer cattle. *Journal of Dairy Science*, 93, 1260-1265.
- Caroli A.M., Chessa S. & Erhardt G.J. (2009).** Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92 (11), 5335-5352.
- Cavalcanti M.T.H., Teixeira M.F.S., Lima Filho J.L. & Porto A.L.F. (2004).** Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardia* sp. *Bioresource Technology*, 93, 29-35.
- Cayot P. & Lorient D. (1998).** Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Lavoisier TEC & DOC, Paris, France.
- Cerning J., Gripon J.C., Lamberet G. & Lenoir J. (1987).** Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Le Lait*, 67, 3-39.

- Charlier C., Cretenet M., Even S. & Le Loir Y. (2009).** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 30-39.
- Chamba J.F. (2000).** L'emmental, un écosystème complexe. Conséquences sur la sélection et l'utilisation des ferments, *Sciences des Aliments*, 20(2),37-54.
- Chemma N. (2017).** La dépendance laitière : où en est l'Algérie? *Revue d'Etudes en Management et Finance d'Organisation*, 5,1-19.ISSN2205X.
- Chen Y., Mant C.T. & Hodges R.S. (2002).** Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic alphahelix. *Journal of Peptides Research*, 59, 18-33.
- Chen G.W., Tsai J.S. & Pan B.S. (2007).** Purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17, 641-647.
- Chen J.M., Al K.F., Craven L.J., Seney S., Coons M., McCormick H., Reid G., O'Connor C. & Burton J.P. (2020).** Nutritional, microbial, and allergenic changes during the fermentation of Cashew 'Cheese' product using a Quinoa-Based Rejuvelac starter culture. *Nutrients*, 12, 648.
- Chiang S.H. & Chang C.Y. (2005).** Antioxidant properties of caseins and whey proteins from colostrums. *Journal of Food Drug Anal.*, 13, 57-63.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamber G. & Lenoir J. (1997a).** Biochimie de l'affinage ; in : « Le fromage (ECK A. & GILLIS J.C) ». TEC & DOC, Lavoisier, Paris, France.
- Cibois P. (1997).** Les Pièges de l'analyse des correspondances. *Histoire & Mesure*, 12, (3/4), 299-320.
- Claeys W.L., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., De Zutter L., Huyghebaert A., Imberechts H., Thiange P., Vandenplas Y. & Herman L. (2013).** Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control*, 31, 251-262.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes L.F. & Chikindas M.L. (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International of Applied Microbiology*, 71, 1-20.
- Cogan T.M. & Hill C. (1993).** Cheese starter cultures; in: "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (FOX P.F.) ». Chapman & Hall, London.
- Coghill D.M., Mutzelburg J.D. & Birch S.J. (1982).** Effect of thermization on the bacteriological and chemical quality of milk. *Australian Journal of Dairy and Technology*, 37(2), 48.
- Coker C.J., Crawford R.A., Johnston K.A., Singh H. & Creamer L.K. (2005).** Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data-a review. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 631-643.
- Colin O. (1990).** Taux protéiques et qualité fromagères des laits : Maitrise des facteurs de production. Thèse de Doctorat, Institut polytechnique de Lorraine, Nancy, France.
- 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(11), 841-866.

- Conesa C., Rota C., Castillo E., Perez M.D., Calvo M. & Sanchez L. (2010).** Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three food borne pathogens. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 209-215.
- Corrêa A.P.F., Daroit D.J., Coelho J., Meira S.M., Lopes F.C., Segalin J. & Brandelli A. (2011).** Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247-2254.
- Courroye M. (1987).** L'indice d'affinage. Un nouveau moyen de suivre la protéolyse des fromages à pâte cuite par cryoscopie. *Les Industries Alimentaires et Agricoles*, 104 (3), 169-173.
- Creamer L. K. & Mills O. E. (1971).** The action of rennets on the caseins. Rennin action on β -casein in solution. *Journal of Dairy Research*, 38, 269-280.
- CrowV., Curry B., Christison M., Hellier K., Holland R. & Liu S. (2002).** Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Australian Journal Dairy Technology*, 57, 99-105.
- Cruz J., Ortiz C., Guzman F., Fernandez-Lafuente R. & Torres R. (2014).** Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21, 2299-2321.
- Curioni P.M.G. & Bosset J.O. (2002).** Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12(12), 959-984.
- Curtin A.C., De Angelis D., Cipriani M., Corbo M.R., McSweeney P.L.H. & Gobbetti M. (2001).** Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 312-321.
- Dahou A.E., Mohammed Ali B.A., Abdelkader H., Bilel L. & Djamel A.S. (2017).** Effect of processing technology on the biodiversity of the Bacterial flora of an Industrial cheese camembert soft type. *Advances in Bioresearch*, 8 (6), 197-207.
- Dal Bello B., Rantsiou K., Bellio A., Zeppa G., Ambrosoli R., Civera T. & Cocolin L. (2010).** Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT Food Science Technology*, 43, 1151-1159.
- Dalgleishd G. (1982).** The enzymatique coagulation of milk; in: « developments in dairy chemistry - 1- Proteins (FOX P.F.) ».USA.
- Dalgleish D.G. (1992).** The enzymatic coagulation of milk. *Advanced Dairy Chemistry Proteins*, 1, 579-619.
- Dalgleish D.G. (1998).** Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81, 3013-3018.
- Dalgleish D.G. (2011).** On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. *Soft Matter*, 7, 2265-2272.
- Dalgleish D. G. & Corredig M. (2012).** The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449-467.
- Dalgleish D.G., Alexander M. & Corredig M. (2004).** Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 18, 747-755.

- Das K., Tiwari R. & Shrivastava D. (2010).** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 104-111.
- Davies D.T & White J.C.D. (1960).** The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases. *Journal of Dairy Research*, 27, 171.
- Davies D.T. & Law A.J.R. (1980).** The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland. *Journal of Dairy Research*, 47, 83-90.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. & Ross P. (2006).** Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- Deeth H.C., Fitzgerald C.H. & Wood A.F. (1975).** A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 30, 109-111.
- DeFigueroa R., Alvarez F., Pesce de Ruiz Holgado A., Oliver G. & Sesma F. (2000).** Citrate utilization by homo- and hetero-fermentative lactobacilli. *Microbiology Research*, 154, 313-320.
- De Figueroa R., Oliver G. & Benito de Cardenas I.L. (2001).** Influence of temperature on flavor compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Microbiology Research*, 155, 257-262.
- De Kruif C.G. & Zhulina E.B. (1996).** κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids Surface*, 117, 151-159.
- De kruif C.G. (1998).** Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *Journal of Dairy Science*, 81 (11), 3019-3028.
- DeKruif C.G, Huppertz T., Urban V.S. & Petukhov A.V. (2012).** Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172, 36-52.
- Desmazeaud M. & Vassal L. (1979).** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles et rôle au cours de l'affinage des fromages. *Le lait*, 59, 327-44.
- Desmazeaud M. (1997).** Aptitude du lait au développement de la flore lactique ; in : « Le Fromage (ECK A. & GALLIS J.C) ». TEC & DOC, Lavoisier, Paris, France.
- Díaz M., Dunn C.M., McClements D.J. & Decker E.A. (2003).** Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2365-2370.
- Dinika I., Kumar V.D., Balia R., Lara U.G. & Ami R. (2020).** Patel Potential of cheese whey bioactive proteins and peptides in the development of antimicrobial edible film composite: A review of recent trends. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 57-67.
- Dionysius D.A., Marschke R.J., Wood A.J., Milne J., Beattie T.R., Jiang H., Treloar T., Alewood P.F. & Grieve P.A. (2000).** Identification of physiologically functional peptides in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 103.
- Diop M.B., Dibois D.R., Tine E., Jacqueline A.N. & Thonart P. (2007).** Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnology, Agronomy and Society Environment*, 11, 275-281.
- Djermoun A. & Chehat F. (2012).** Le développement de la filière lait en Algérie : de l'autosuffisance à la dépendance. *Livestock Research for Rural Development*; 24 (1), 2012.
- Donkor O.N., Henriksson A., Singh T.K., Vasiljevic T. & Shah N.P. (2007).** ACE inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1321-1331.

- Dorioz J.M., Fleur P. Coulon J.B. & Martin M. (2000).** La composante du milieu physique dans l'effet terroir pour la production fromagère ; quelques réflexions à partir du cas des fromages des Alpes du Nord. *Courrier de l'Environnement de l'INRA*, 40, 47-55.
- Dortu C. & Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy and Society Environment*, 13(1), 143-154.
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M. & Prévost H. (2006).** The continuing story of class II a bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564-582.
- DSA (Direction des Services Agricoles) (2018).** Statistiques de la Wilaya de Tizi-Ouzou. (<https://www.ummtto.dz/wpcontent/uploads/2019/06/Annuaire-statistique-de-la-Wilaya-de-Tizi-Ouzou-.Ann%C3%A9e>).
- Dumitrașcu L., Stănciuc N., Stanciu S. & Râpeanu G. (2012).** Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk: a comparative kinetic and thermodynamic study. *Journal of Food Engineering*, 113, 47-52.
- Dupas C., Adt I., Cottaz A., Boutrou R., Molle D., Jardin J., Juvet T. & Degraeve P. (2009).** A chromatographic procedure for semi-quantitative evaluation of caseinphosphopeptides in cheese. *Dairy Science and Technology*, 89, 519-529.
- Dupont D., Arnould C., Rolet-Repecaud O., Duboz G., Faurie F., Martin B. & Beuvier E. (2006).** Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies. *International Dairy Journal*, 16, 1081-1087.
- El-Gazzar F. & Marth E.H. (1992).** *Salmonella*, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. *Journal of Dairy Science*, 75(9), 2327-2343.
- Elias R.J., Kellerby S.S. & Decker E.A. (2008).** Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.
- Engel E., Septier C., Leconte N., Salles C. & Le Quere J. (2001).** Determination of taste-active compounds of a bitter Camembert cheese by omission tests. *Journal of Dairy Research*, 68 675-688.
- Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A. & Grodsky G.M. (2003).** Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β cell dysfunction. *Diabetes*, 52, 1-8.
- Everard C.D., O'Callaghan D.J., Mateo M.J., O'Donnell C.P., Castillo M. & Payne F.A. (2008).** Effects of cutting intensity and stirring speed on syneresis and curd losses during cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 91 (7), 2575-2582.
- Fallico F., McSweeney P. L. H., Siebert K. J., Horne J., Carpino S. & Licitra G. (2004).** Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 3138-3152.
- Farnaud S. & Evans R.W. (2003).** Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*. 40, 395-405.
- Farrell H.M., Jimenez-Flores Jr.R. , Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L. , Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F. & Swaisgood H.E. (2004).** Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.

- Farrell H. M., Malin E.L., Brown E.M. & Qi P.X. (2006a).** Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. *Current Opinion in Colloidal and Interface Science*, 11, 135-147.
- Farrell H.M., Qi P.X. & Uversky V.N. (2006b).** New views of protein structure: Applications to the caseins: Protein structure and functionality. *Advances in Biopolymers*, 935, 52-70.
- Farvin K.H.S., Baron C.P., Nielsen N.S., Otte J. & Jacobsen C. (2010).** Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2-Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123 1090-1097.
- Fialho T.L., Carrijo L.C., Magalhães Júnior M.J., Baracat-Pereira M.C., Piccoli R.H. & de Abreu L.R. (2018).** Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, 107, 406-413.
- Fedio W.M., Schoonderwoerd M., Shute R.H. & Jackson H. (1990).** A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. *The Canadian Veterinary Journal*, 31(11), 773-775.
- Fitzsimons N. A., Cogan T. M., Condon S. & Beresford T. (2001).** Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 600-608.
- Flament C. & Milland L. (2003).** Un effet Guttman dans l'analyse des représentations sociales, Méthodes d'étude des représentations sociales, J.C. Abric (éd.), Saint-Agnes, Erès, 201-220.
- Fleet G.H. (1990).** Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211.
- Fontán M.C.G., Franco I., Prieto B., Tornadijo M.E. & Carballo J. (2001).** Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiology*, 18(1), 25-33.
- Fox P.F. & Mulvihill D.M. (1982).** Milk proteins: Molecular, colloidal and functional properties. *Journal of Dairy Research*, 49, 679-93.
- Fox P.F. (1989).** Developments in dairy chemistry. Functional proteins, vol 4. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Fox P.F., Law J., McSweeney P.L.H. & Wallace J. (1993).** Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Springer, Boston.
- Fox P.F., Snigh T.R. & Sweeney M.C. (1994).** Proteolysis in cheese during ripening; in: « Biochemistry of milk products (FOX P.F.) ». The Royal Society of chemistry, London.
- Fox P.F., O'Connor T.O., McSweeney P.L., Guinee T.P & O'Brien N.M. (1996).** Cheese: Physical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39, 163-328.
- Fox P.F & Wallace J.M. (1997).** Formation of flavor compounds in cheeses; in :« *Advances in Applied Microbiology* (NEIDLEMAN S & LASKIN A.)». Elsevier, Masson, USA.
- Fox P. F. & McSweeney P. L. H. (1998).** Dairy chemistry and biochemistry. Cork, Ireland.
- Fox P.F & McSweeney P.L.H. (2004).** Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; in :« General Aspects (FOX P.F, MCSWEENEY P.L.H. & GUINEE T.P.) ». Academic Press, Netherland.

- Franco I., Prieto B., Urdiales R., Fresno J.M. & Carballo, J. (2001).** Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de A liva cheese: a Spanish traditional variety. *Food Chemistry*, 74, 463-469.
- Frétin M., Ferlay A., Verdier-Metz I., Fournier F., Montel M.S., Farruggia A., Delbès C. & Martin B. (2017).** The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses. *International Dairy Journal*, 64, 56-67.
- Fröhlich-Wyder M.T., Bisig W. & Guggisberg D. (2015).** Influence of low pH on the metabolic activity of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* strains in Tilsit-type model cheese. *Dairy Science and Technology*, 95, 569-585.
- Gagnaire V., Molle D., Herrouin M. & Leonil J. (2001).** Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4402-4413.
- Gagnaire V., Carpino S., Pediliggieri C., Jardin J., Lortal S. & Licitra G. (2011).** Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of Ragusano Cheese revealed by tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12443-12452.
- Galli B.D., Baptista D.P., Cavaleiro F.G., Negrão F., Eberlin M.N., Gigante M.L. (2019).** Peptide profile of Camembert-type cheese: Effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International* 123, 393-402.
- Gallinat J.L., Qanbari S., Drögemüller C., Pimentel E.C.G, Thaller G. & Tetens J. (2013).** DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of Dairy Science*, 96, 699-709.
- Garabal J.I. (2007).** Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology*, 10, 1-3.
- Garcia-Nebot M.J., Recio I. & Hernandez-Ledesma B. (2014).** Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry and Toxicology*, 65, 155-161.
- Garnier J., Mocquoi G., Ribadeau-Dumas B. & Maubois J.L. (1968).** Coagulation du lait par la présure ; aspects scientifiques et technologiques. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 22, 495-552.
- Gatti M., Bottari B., Lazzi C., Neviani E. & Mucchetti G. (2014).** Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, 97, 573-591.
- Ghazi K. & Niar A. (2011).** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicultura*, 29, 4, 193-196.
- Giaccone D., Chion A.R., Galassi L., Bianchi P., Battelli G., Coppa M. Tabacco E. & Borreani G. (2016).** Effect of milk thermisation and farming system on cheese sensory profile and fatty acid composition. *International Dairy Journal*, 59, 10-19.

- Gobbetti M., Lowney S., Smacchi E., Battistotti B., Damiani P. & Fox P.F. (1997).** Microbiology and biochemistry of taleggio cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7 (8-9), 509-517.
- Gobbetti M., Morea M. & Baruzzi F. (2002).** Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 12(6), 511-523.
- Gobbetti M., De Angelis M., Cagno R. Di, Mancini L. & Fox P. F. (2015).** Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Science Technology*, 45, 167-178.
- Gomez-Ruiz J.A., Ramos M. & Recio I. (2004).** Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolate from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14, 1075-1080.
- Gong H.S., Meng X.C. & Wang H. (2010).** Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella thypimurium*. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 37-44.
- Gonzalez J., Mas M., Tabla R., Moriche J., Roa I., Rebollo J.E. & Cáceres P. (2003).** Autochthonous starter effect on the microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics of Iborea goat's milk cheeses. *Le Lait*, 83, 193-202.
- Goulden J.D.S., (1964).** Analysis of Milk by infra-red absorption. *Journal of Dairy Research*, 31, 273-284.
- Gouldsworthy A.M., Leaver J. & Banks J.M. (1996).** Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 6, 781-790.
- Grattepanche F., Audet P. & Lacroix C. (2007).** Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*, 17, 12-132.
- Green M. & Morant S. (1981).** Mechanism of aggregation of casein micelles in rennet treated milk. *Journal of Dairy Research*, 48 (1), 57-63.
- Gripot J.C., Desmazeaud M.J., Lebars D. & Bergere J.L. (1975).** Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages : II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- Guéguen M. & Schmidt J.L. (1992).** Les levures et *Geotrichum candidum* ; in : « Les Groupes Microbiens d'Intérêt Laitier (HERMIER J. & LENOIR F.W.) ». CEPIL, Paris, France.
- Guerra-Martínez J.A., Montejano J.G. & Martín-del-Campo S.T. (2012).** Evaluation of proteolytic and physicochemical changes during storage of fresh Panela cheese from Queretaro, Mexico and its impact in texture. *Cyta Journal Food*, 10, 296-305.
- Guillou H., Pélissier J.P. & Grappin R. (1986).** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, 66, 143-175.
- Guizani N., Kasapis S., Al-Attabi Z.H. & Al-Ruzeiki M.H. (2002).** Microbiological, physicochemical, and biochemical changes during ripening of camembert cheese made of pasteurized cow's milk. *International Journal of Food Properties*, 5, 483-494.
- Guha H., Sharma E., Kr Deshwal G. & Singh Rao P. (2021).** A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Production Processing and Nutrition*, 3, 2-20.

- Gunasekaran S. & Ak M.M. (2002).** Cheese Rheology and texture. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Gupta A., Mann B., Kumar R. & Sangwan R.B. (2009).** Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *Journal of Dairy Technology*, 62, 339-349.
- Ha G.E., Chang O.K., Jo S.M., Han G.S., Park B.Y., Ham J. S.& Jeong S. G. (2015).** Identification of antihypertensive peptides derived from low molecular weight caseinhydrolysates generated during fermentation by *Bifidobacterium longum* KACC 91563. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 738-747.
- Hadji-Koudri E.D., Harrache B. & Ben amirouche H. (2018).** Analyse structurale de la filière lait en Algérie. *Revue des Economies Nord Africaines*, 14(19), 39-47.
- Haileselassie S.S., Lee B.H. & Gibbs B.F. (1998).** Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1612-1617.
- Hallen E., Lunden A., Allmere T. & Andren A. (2010).** Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, 77(1), 71-76.
- Hamiroune M., Berber A. & Boubekour S. (2014).** Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 158, 137-144.
- Hardy, J.(1997).** L'activité de l'eau et le salage des fromages ; in : « Le Fromage (ECK A. & GILLIS J.) ». TEC & DOC, Lavoisier, Paris, France.
- Hassouna M., Nafti A. & Ghrir R. (1996).** L'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte fleuri de type Camembert au lait cru de brebis: aspects microbiologiques et physico-chimiques. *Science des Aliments*, 16, 187-203.
- Hayes A., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C. & Stanton C. (2006).** Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2260-2264.
- Hekken D.L.V., Tunick M.H., Malin E.D. & Holsinger V.H. (2007).** Rheology and melt characterization of low-fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 89-98.
- Heo S.J., Park E.J., Park P.J. & Jeon Y.J. (2005).** Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96, 1613-1623.
- Hernández-Galán L., Cardador-Martínez A., Picque D., Spinnler H.E, López-del Castillo Lozano M. & Martín del Campo S.T. (2016).** Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and antioxidant peptides release during ripening of mexican Cotija Hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85-91.
- Hernandez-Ledesma B., Davalos A., Bartolome B. & Amigo L. (2005).** Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactoalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.
- Holt C. (1992).** Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 4, 63-151.
- Holt C. & Horne D.S. (1996).** The dairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 85-111.

- Holt C., Wahlgren N.M. & Drakenberg T. (1996).** Ability of a β -casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters. *Biochemistry Journal*, 314, 1035-1039.
- Holzappel W.H., Geisen R. & Schillinger U. (1995).** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24(3), 343-362.
- Horne D.S. (1986).** Steric stabilization and casein micelle stability. *Journal of Colloidal International Science*, 250-260.
- Huppertz T., Fox P.F. & Kelly A.L. (2018).** The caseins: structure, stability, and functionality. *Proteins in Food Processing*, 3, 49-92.
- Institut National de l'Origine et de la Qualité (INAO) (2012).** Cahier des charges de l'appellation d'origine « Camembert de Normandie », 1-17.
- Ilboudou A.J., Savadogo A., Seydi M.G. & Traore A.S. (2012).** Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation pressurée du lait. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 6075-6087.
- Irlinger F. & Mounier J. (2009).** Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 142-148.
- Jarmolowska B., Kostyra E., Krawczuk S. & Kostyra H. (1999).** β -Casomorphin-7 isolated from brie cheese. *Science of Food and Agriculture*, 79(13), 1788-1792.
- Jarrige R. & Rossetti C. (1957).** Etudes sur les variations de la richesse en constituants azotés des laits de vache. Evolution au cours de la lactation et de la gestation. *Annales de Zootechnie*, 6, 41-63.
- Je J.Y., Qian Z.J., Byun H.G. & Kim S.K. (2007).** Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840-846.
- Jeanet R., Croguennec T., Schuck P. & Brulé G. (2007).** Science des aliments : Biochimie Microbiologie-Procédés-Produits. Lavoisier. TEC & DOC, Paris, France.
- Jeanet R., Croguennec T., Schuck P., Michel M. & Brulé G. (2008).** Produits laitiers. TEC & DOC. Lavoisier, Paris, France.
- Ji J., Sharma V., Qi S., Guarch M.E., Zhao P., Luo Z., Fan W., Wang Y., Mbabaali F., Neculai D., Esteban M., Pherson J., Batada N. (2014).** Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2 (1), 44-51.
- Jin Y., Yu Y., Qi Y., Fangjunwang B., Yan J. & Zou H. (2016).** Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*, 141, 24-46.
- Joffin C. & Joffin J.N. (1999).** Microbiologie alimentaire. CRDP Aquitaine, Bordeaux.
- JORADP (Journal officiel de République Algérienne Démocratique et Populaire) (2014).** Arrêté 17 du 17-12-2013 relatif à la détermination de la matière grasse dans le fromage. JORADP n°67 du 12-11-2014.
- Jordan K. N. & Cogan T. M. (1999).** Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 136-140.
- Kable M.E., Srisengfa Y., Laird M., Zaragoza J., McLeod J., Heidenreich J. & Marco M.L. (2016).** The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the

- impact of transfer to a milk processing facility. *American Society for Microbiology*, 7 (4), 1-12.
- Kacimi-El Hassani S. (2013).** La Dépendance Alimentaire en Algérie : Importation de Lait en Poudre versus Production Locale, Quelle Evolution ? Méditerranéen Journal of Social Sciences MCSER Publishing, Rome-Italy.
- Kali S., Benidir M., Ait Kaci K., Belkheir B. & Benyoucef M.T. (2011).** Situation de la filière lait en Algérie : Approche analytique d'amont en aval. *Livestock Research for Rural Development*, 23(8).
- Kalli S., Saadaoui M., Ait Amokhtar S., Belkheir B., Benidir A., Bitam M. & Benmebarek A. (2018).** Éléments d'enquête générale sur la filière lait en Algérie. *International Journal of Business and Economic Strategy*, 8, 12-19.
- Kaouche-Adjlane S., Ghozlane F. & Mati A. (2015).** Typology of dairy farming systems in the Mediterranean basin (case of Algeria). *Biotechnology in Animal Husbandry*, 31(3), 385-396.
- Kesenkas H. & Akbulut N. (2008).** Yeasts as ripening adjunct cultures in Turkish white brined cheese production. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 32, 327-333.
- Khider1 M. & Elbanna K. (2017).** Extending the shelf life of Camembert cheese via controlling over-ripening by bacteriocin of newly lactic acid bacterial isolate LAB100. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(2), 88-98.
- Kilcawley K.N. (2017).** Cheese flavor; in: « Fundamentals of Cheese Science (Fox, P.F, Guinee, T.P, Cogan, T.M & Mc Sweeney P.L.H.) ». Springer, USA.
- Kim S. K. & Wijesekara I. (2010).** Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*, 2, 1-9.
- Kindstedt P.S. (2014).** The basis of cheesemaking; in: «Cheese and Microbes (DONNELLY C.W.) ». ASM Press, Washington, USA.
- Kirchmeir O. (1973).** Arrangement of components, electrical charge and interaction energies of casein micelles. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 27, 191.
- Kirdar S.S., Yurdakul O.K., Kalit S. & Kalit M.T. (2018).** Microbiological changes throughout ripening of Keş cheese. *Journal of Central European Agriculture*, 19(1), 61-71.
- Kitts D.D. & Weiler K. (2003).** Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323.
- Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12, 39-86.
- Klompong V., Benjakul S., Kantachote D. & Shahidi F. (2007).** Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 120-131.
- Kocak A., Sanli T., Anli E.A., & Hayaloglu A.A. (2020).** Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. *LWT-Food Sciences and Technology*, 123, 109-127.
- Kondylia E., Katsiaria M.C., Masourasb T. & Voutsinas L.P. (2002).** Fatty acids and volatile compounds of low-fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture. *Food Chemistry*, 79, 199-205.

- Korhonen H. (2009).** Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
- Korhonen H. & Pihlanto A. (2007).** Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 829-843.
- Korhonen H.K. & Marnila P. (20103).** Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health; in: « Biotechnology and Food Research (YOUNG W.P. & GEORGE F.W.) ». MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland.
- Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K. & Oki T. (2001).** Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Journal of the Japanese Society of Food Sciences*, 48, 44-50.
- Kum Y. L., Barbano D.M. & Rasmussen R.R. (1991).** Influence of Pasteurization of Milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, 74, 727-740.
- Kumar D., Kumar Chatli M., Singh R., Mehta N. & Kumar P. (2016b).** Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science and Technology*, 96, 391-404.
- Laemmli V.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Larpernt J.P & Bourgeois C.M. (1989).** Les fermentations alimentaires. Lavoisier, TEC & DOC, Paris, France.
- Lavasani A.R.S., Ehsani M.R., Mirdamadi S. & Mousavi S.M. (2012).** Study of proteolysis and lipolysis of probiotic Lighvan cheese. *International Journal of Agricultural Science*, 2(4), 341-352.
- Lazereg M., Bellil K., Djediane M., Zaidi Z. (2020).** La filière lait en Algérie face aux conséquences de la pandémie de la COVID-19. *Les Cahiers du CREAD*, 36(3), 227-250.
- Le Bars D., Desmazeaud M.J., Gripon J.C. & Bergere J.L. (1975).** Etude du rôle des micro-organismes et de leurs enzymes dans la maturation des fromages. I. Fabrication aseptique d'un caillé modèle. *Le Lait*, 55, 377-389.
- Leclercq-Perlat M.N., Oumer A., Buono F., Bergere J.L., Spinnler H.E. & Corrieu G. (2000).** Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of soft Smear cheese from reconstituted milk: Protein degradation. *Journal of Dairy Science*, 83(8), 1674- 1683
- Leclercq-Perlat M.N., Buono F., Lambert F., Latrille E., Spinnler E.R. & Corrieu G. (2004).** Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research*, 71, 346-354.
- Le graet Y., Lepienne A., Brule G. & Ducruet P. (1983).** Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Le Lait*, 63, 317-332.
- Lenoir J. (1963a).** La flore microbienne du Camembert et son évolution au cours de la maturation. *Le Lait*, 43, 262-270.
- Lenoir J. (1963b).** Note sur la dégradation des protides au cours de la maturation du Camembert. *Le Lait*, 43 ,154-165.

- Lenoir J. (1984).** The surface flora and its role in the ripening of cheese. *Bulletin-Federation Internationale de Laiterie*, 171, 3-20.
- Leroy F. & DaVuyst L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67-78.
- Lessard M.H., Bélanger G., St-Gelais D., Labrie S. (2012).** The composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 1813-1819.
- Li N., Wang Y., You C., Ren J., Chen W., Zheng H. & Liu Z. (2018).** Variation in Raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Scientific Reports*, 2371 (8), 1-10.
- Lignitto L., Segato S., Balzan S., Cavatorta V., Oulahal N., Sforza S., Degraeve P., Galaverna G. & Novelli E. (2012).** Preliminary investigation on the presence of peptides inhibiting the growth of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in Asiago d'Alleva cheese. *Dairy Science and Technology*, 92(3), 297-308.
- Liu Y. & Pischetsrieder M. (2017).** Identification and relative quantification of bioactive peptides sequentially released during simulated gastrointestinal digestion of commercial kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(9), 1865-1873.
- Lopez-Exposito I. & Recio I. (2006).** Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1294-1305.
- López-Expósito I., Miralles B., Amigo L., Hernández-Ledesma B. (2016).** Health effects of cheese components with a focus on bioactive peptides; in: «Fermented Foods in Health and Disease Prevention (FRIAS J., MARTINEZ-VILLALUENGA C. & PEÑAS E.) ». Academic Press, Cambridge, USA.
- Lorenzen P.C., Martin D., Clawin-Raedeker I., Barth K. & Knappstein K. (2010).** Activities of alkaline phosphatase, gamma-gutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89, 18-23.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193, 265-275.
- Lucey J. A. & Singh H. (1998).** Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30, 529-542.
- Lucey J.A., Otter D. & Horne D.S. (2017).** A 100-Year Review: Progress on the chemistry of milk and its components. *Journal of Dairy Science*, 100, 9916-9932.
- Lucey J.A. & Horne D.S. (2018).** Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*, 28, 56-65.
- Lynch C. M., Muir C. C., Banks J. M., McSweeney P. L. H. & Fox P. F. (1999).** Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 82, 1618-1628.
- Madani T., Mouffok C. & Frioui M. (2004).** Effet du niveau de concentré dans la ration sur la rentabilité de la production laitière en situation semi-aride algérienne. *Revue de Recherche Ruminants*, 1, 120-224.
- Madani T. & Mouffok C. (2008).** Production laitière et performances de reproduction des vaches Montbéliardes en région semi-aride algérienne. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 61 (2), 97-107.

- Mahaut M., Jeantet R. & Brule G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. TEC&DOC. Lavoisier, Paris, France.
- Madkor S.A., Tong P.S. & El Soda M. (2000).** Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of *Lactobacilli*. *Journal of Dairy Science*, 83, 1684-1691.
- Madureira A.R., Tavares T., Gomes A.M.P., Pintado M.E. & Malcata F.X. (2010).** Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93, 437-455.
- Maisnier-Patin S., Deschamps S.N., Tatini S.R. & Richard J. (1992).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Le Lait*, 72, 249-263.
- Makhlouf M. (2015).** L'impact de la nouvelle politique laitière sur la performance de la filière locale : cas de la wilaya de Tizi-Ouzou, Algérie. *Livestock Research for Rural Development*, 27(11), 1-7.
- Makhlouf M., Montaigne E. & Tessa A. (2015).** La politique laitière algérienne: entre sécurité alimentaire et soutien différentiel de la consommation. *New Mediterranean Journal of Economics*, 14(1), 12-23.
- Makhlouf M. & Montaigne E. (2017).** Impact de la nouvelle politique laitière algérienne sur la viabilité des exploitations laitières. *CIHEAM-IAMB*, 16 (1), 2-10.
- Malkoski M., Dashper S. G., O'Brien-Simpson N.M., Talbo M. Macris G. H. & Cross. K. J. (2001).** Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 2309-2315.
- Mane A. & McSweeney P.L.H. (2019).** Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 1-14.
- Mangia N.P., Murgia M.A., Maria G.G., Deiana G.S.P. (2008).** Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25(2), 366-377.
- Manolkidis C., Polychroniadou A. & Alichanidis E. (1970).** Variations in the composition of Teleme cheese. *Le Lait*, 50, 38-48.
- Mansour A. & Alais C. (1972).** Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. I. Aspect biochimique : Evolution de la composition du fromage et rendement. *Le Lait*, 52, 515-535.
- Martin S., Picque D., Cosio-Ramirez R. & Corrieu G. (2007).** Evaluation of chemical parameters in soft mold-ripened cheese during ripening by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 90, 3018-3027.
- Martínez-Maqueda D., Miralles B., Cruz-Huerta E. & Recio I. (2013).** Casein hydrolysate and derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in human intestinal cells. *International Dairy Journal*, 32, 13-19.
- Martini S., Conte A. & Tagliazucchi D. (2020).** Effect of ripening and in vitro digestion on the evolution and fate of bioactive peptides in Parmigiano-Reggiano cheese. *International Dairy Journal*, 105, 104668.
- Martley F.G. & Crow V.L. (1993).** Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*, 3, 461-483.
- Maruyama S. & Suzuki H. (1982).** A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1393-1394.

- Maruyama S., Mitachi H., Awaya J., Kurono M., Tomizuka N. & Suzuki H. (1987).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α s1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2557-2561.
- Mas M., Tabla R., Moriche J., Roa I., Gonzalez J., Rebollo J.E. & Cáceres P. (2002).** Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Le Lait*, 82, 579-587.
- Mateo M.J., O'Callaghan D.J., Everard C.D., Fagan C.C., Castillo M., Payne F.A. & O'Donnell C.P. (2009).** Influence of curd cutting program and stirring speed on the prediction of syneresis indices in cheese-making using NIR light backscatter. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 950-955.
- McMahon D.J. & Brown R.J. (1984).** Composition, structure, and integrity of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 67, 499-512.
- McMahon D.J. & McManus W.R. (1998).** Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, 81, 2985-2993.
- McSweeney P.L.H., Fox P.C., Lucey J.A., Jordan K.N. & Cogan T.M. (1993).** Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3, 613-634.
- McSweeney P.L.H. & Fox P.F. (1997).** Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le Lait*, 77, 41-76.
- McSweeney P.L. H. (2004).** Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127-144.
- McSweeney P.L.H. & Sousa M.J. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Le Lait*, 80, 293-324.
- McSweeney P. L. H. & Fox P. F. (2017).** Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate; in: « Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (MCSWEENEY P.F., FOX P. & EVERETT D.C.) ». Academic Press, London, UK.
- Meira S. M. M., Daroit D. J., Helfer V. E., Corrêa A. P. F., Segalin J., Carro S. & Brandelli A. (2012).** Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.
- Meisel M. & Schlimme S. (1994).** Inhibitors of angiotensin I-converting enzyme derived from bovine casein (casokinins), β -casomorphins and related peptides; in: «Recent developments (BRANTL V. & TESCHEMACHER H.) ». Weinheim, Germany.
- Meslem M.A. (2019).** La stratégie ONIL pour le développement de la filière lait en Algérie. Division Appui au Développement de la Production Laitière. <https://onil.dz/resume-de-la-strategie-onil-pour-le-developpement-de-la-filiere-lait-en-algerie>.
- Michel V., Hauwuy A. & Chamb J.F. (2001).** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Le Lait*, 81, 575-592.
- Mietton B., Gaucheron F. & Salaum F. (2004).** Minéraux et transformations fromagères ; in: « Minéraux et Produits Laitiers (GAUCHERON F.) ». TEC & DOC, Lavoisier, Paris, France.
- Miguel M., Recio I., Ramos M., Delgado M.A. & Aleixandre M.A. (2006).** Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3352-3359.

- Mistry V.V. & Kasperson K.M. (1998).** Influence of Salt on the Quality of Reduced Fat Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 81 (5), 1214-1221.
- Mohanty D.P., Mohapatra S., Misra S. & Sahu P.S. (2016).** Milk derived bioactive peptides and their impact on human health–A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 577-583.
- Molimard P., Vassal L., Bouvier I. & Spinnler H.E. (1995).** Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type Camembert. *Le Lait*, 75, 3-16.
- Molimard P. & Spinnler H.E. (1996).** Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Moraes P.M., Perin L.M, Beatriz M., Ortolani T., Keizo Yamazi A., Nogueira Viçosa G. & Augusto Nero L. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1320-1324.
- Morel G. (2012).** La levure *Geotrichum candidum* : Taxonomie, Biodiversité et Génome. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud XI Orsay, France.
- Morr C.V., Lin S.H.C., Dewan R.K. & Bloomfield V.A. (1973).** Molecular weights of fractionated bovine milk caseins. Micelles from analytical ultracentrifugation and diffusion measurements. *Journal of Dairy Science*, 56, 415-418.
- Motta A.S. & Brandelli A. (2002).** Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-70.
- Mourgues R., Vassal L., Auclair J., Mocquot G., Vandeweghe J., Deschamps N., Vachot J.C. & Nicolas M. (1977).** Origine et développement des bactéries coliformes dans les fromages à pâte molle. *Le Lait*, 57, 131-149.
- Murray B.A. & Fitz-Gerald R.J. (2007).** Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773-791.
- MurtazaM. A., Ur-Rehman S., Anjum F. M., Huma N. & Hafiz I. (2014).** Cheddar cheese ripening and flavor characterization. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 54, 1309-1321.
- Mushtaq M., Gani A., Masoodi F.A. & Ahmad M. (2016).** Himalayan cheese (Kalari/Kradi) -Effect of different probiotic strains on oxidative stability, microbiological, sensory and nutraceutical properties during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 74-81.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. & Takano T. (1995a).** Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. & Takano T. (1995b).** Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.
- Nalepa B., Olszewskaa M.A. & Markiewicz L.H. (2018).** Seasonal variances in bacterial microbiota and volatile organic compounds in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 70-76.

- Niidome T., Matsuyama N., Kuniyama M., Hatakeyama T. & Aoyagi H. (2005).** Effect of chain length of cationic model peptides on antibacterial activity. *Bulletin of Chemical Society Japan*, 78, 473-476.
- Nöbel S., Weidendorfer K. & Hinrichs J. (2012).** Apparent voluminosity of casein micelles determined by rheometry. *Journal of Colloid Interface Science*, 386, 174-180.
- Nongonierma A.B. & Fitzgerald R.J. (2016).** Strategies for the discovery, identification, and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 26-43.
- OCDE/FAO (2016).** « Lait et produits laitiers », dans Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2016-2025, Éditions OCDE, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outlook-2016-11-fr>.
- Oner Z. & Sardag A.M. (2018).** Identification of bioactive peptides in kashar cheese and its antioxidant activities. *International Journal of Agriculture Environment and Food Science*, 2(2), 44-49.
- Ong L., Henriksson A. & Shah N.P. (2007).** Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Le Lait*, 87, 149-165.
- Ong L. & Shah N.P. (2008a).** Release and identification of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Food Sciences and Technology*, 41, 1555-1566.
- O.N.S. Office National des Statistiques, (2018).** La Production campagnes 2016/2017 et 2017/2018. Bulletin N°818. http://www.ons.dz/IMG/pdf/E.Production_Agricole2017/18.
- O.N.S. (office national des statistiques) (2020).** Collection Statistiques N°2018/2020, Série Economie N°105. L'activité industrielle durant l'année 2019. www.ons.dz. consulté le 08/12/2020.
- Orlyuk Y.T. & Stepanishchev M.I. (2014).** Assessment of proteolysis and lipolysis intensity in pechersky cheese ripening in the presence of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* molds. *Foods and Raw Materials*, 2(1), 36-39.
- Ortolani M.B.T, Yamazi A.K., Moraes P., Viçosa G.G. & Nero L.A. (2010).** Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp. and *Staphylococcus aureus*. *Food borne Pathogens and Disease*, 7(2), 175-180.
- Otte J., Shalaby S.M.A., Zakora M. & Nielsen M.S. (2007).** Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17, 1460-1472.
- Ouarfli L. & Chehma A. (2018).** Effet du régime alimentaire sur les potentialités laitières des bovins en régions sahariennes: cas de la région Ghardaïa (Algérie). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6 (3), 323-329.
- Oyaizu M. (1986).** Studies on products of products reaction antioxidative activities of proproducts of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

- Öztürk H.I. & Akin N. (2017).** Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674-682.
- Padilla M. & Gherzi G. (2001).** Le marché international du lait et des produits laitiers ; in: «Les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée : état des lieux, problématique et méthodologie pour la recherche (PADILLA M., BEN SAÏD T., HASSAINYA J. & GRUSSE P.)». CIHEAM, Montpellier, France.
- Pattorn S. & Hongsprabhas P. (2013).** Effect of coagulants on antioxidant capacity of milk protein curds and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37(2), 203-211.
- Pattorn S., Horimoto Y., Hongsprabhas P. & Yada R.Y. (2012).** Influence of aggregation on the antioxidative capacity of milk peptides. *International Dairy Journal*, 25, 3-9.
- Pellegrini A., Dettling, C., Thomas U., Hunziker P. (2001).** Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 131-140.
- Peters R.R., Chapin L.T., Emery R.S. & Tucker H.A. (1981).** Milk yield, feed intake, prolactin, growth hormone and glucocorticoid response of cows to supplemental light. *Journal of Dairy Science*, 64, 1671-1678.
- Phadungath C. (2005).** Casein micelle structure: a concise review. *Journal of Science and Technology*, 27, 202-212.
- Phillips C.J.C. & Schofield A. (1989).** The effect of supplementary light on the production and behaviour of dairy cows. *Animal Production*, 48, 293-303.
- Pierre A., Michel F., Le Graët Y. & Berrier J. (1999).** Soft goat cheeses at different ripening stages: cheese structure, composition and non solvent water. *Le Lait*, 79, 489-501.
- Pihlanto A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
- Polychroniadou A. (1988).** A simple procedure using tri-nitro-benzene-sulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. *Journal of Dairy Research*, 55, 585-596.
- Porcellato D., Ostlie H. M., Brede M. E., Martinovic A. & Skeie S. B. (2013).** Dynamics of starter, adjunct non-starter lactic acid bacteria and propionic acid bacteria in low-fat and full-fat Dutch type cheese. *International Dairy Journal*, 33, 104-111.
- Power O., Jakeman P., FitzGerald R.J. (2013).** Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797-820.
- Pritchard S.R., Phillips M. & Kailasapathy K. (2010).** Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43, 1545-1548.
- Prieto B., Franco I., Fresno .H.M., Bernardo A. & Carballo J. (2000).** PicoHn Bejes-Tresviso blue cheese: an overall biochemical survey throughout the ripening process. *International Dairy Journal*, 10, 159-167.
- Prieto B., Franco I., Fresno .H.M., Bernardo A. & Carballo J. (2002).** Compositional and Physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of Leon raw cow's milk cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 725-735.
- Quirós A., Ramos M., Muguerza B., Delgado M.A., Miguel M., Alexandre A. & Recio I. (2007).** Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33-41.

- Rafiq S., Huma N., Pasha I., Shahid M. & Xiao H. (2017).** Angiotensin-converting enzyme-inhibitory and anti-thrombotic activities of soluble peptide extracts from buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 380-388.
- Rafiq S., Gulzar N., Sameen A., Huma N., Hayati I. & Jaz R. (2020).** Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 74, 1-16.
- Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y. & Kim S.K. (2005).** Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175-182.
- Ramet J.P. (1985).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Etude FAO Production et santé animale, 48.
- Ramet J.P. (1987).** La préparation du caillé, 1- La présure et les enzymes coagulantes ; in « Le fromage (ECK A.) ». Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France.
- Ramet J.P. (1997).** L'égouttage du coagulum ; in : « le fromage (ECK A. & GILLIS J.C.). Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France.
- Randoin L. & Jourdan C. (1952).** Détermination des teneurs en eau et matière sèche, en calcium et en phosphore de deux variétés de fromages à pâte demi-dure et à moisissures internes. *Le lait*, 318, 480-485.
- Ribadeau-Dumas B. & Grappin R. (1989).** Milk protein analysis. *Le Lait*, 69, 357- 416.
- Richard J. & Zadi H. (1983).** Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Le Lait*, 63, 25-42.
- Richard J. & Gratadoux J.J. (1984).** Evolution de la flore microbienne à la surface des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Le Lait*, 64, 645-646.
- Richoux R. & Kerjean J. (1995).** Caractérisation technologique de souches pures de bactéries propioniques : test en mini fabrication de fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 75, 45-59.
- Rodriguez E., Calzada J., Arqués J.L., Rodriguez J.M., Nunez M. & Medina M. (2005).** Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* 0157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 51-57.
- Romnee J.M. (2009).** Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infrarouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait. Thèse de Doctorat, Université de Gembloux, Belgique.
- Rutzinski J. L., Marth E. H. & Olson N. F. (1979).** Behaviour of *Enterobacter aerogenes* and *Hafnia* species during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection*, 42, 790-793.
- Ryhanen E.L., Pihlanto-Leppala A. & Pahkala E. (2001).** A new type of ripened, low fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11, 441-447.
- Saboya L.V., Goudéranche H., Maubois J.L., Lerayer A.L.S. & Lortal S. (2001).** Impact of broken cells of *lactococci* or *propionibacteria* on the ripening of Saint-Paulin UF-cheeses: extent of proteolysis and GC-MS profiles. *Le Lait*, 81, 699-713.
- Sahingil D., Hayaloglu A.A., Simsek O. & Ozer B. (2014).** Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brind cheese: effects of ripening temperature and adjunct culture. *Dairy Science and Technology*, 94, 603-623.

- Sahraoui Y., Fayolle K., Leriche F., Le Flèche-Matéos A. & Sadoun D. (2015).** Antibacterial and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* KJ660075 strain selected for its inhibitory power against *Staphylococcus aureus* for cheese quality improving. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7133-7142.
- Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai T. & Itoh T. (2000).** Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
- Salvat-Brunaud D., Maubois G.L., Le Graët Y., Piat M., Maillard M.B., Corre C., Thierry A. (1995).** Extraction et analyse de la phase aqueuse de l'emmental à 4 stades d'affinage. *Le Lait*, 75, 239-249.
- Sandra S., Alexander M. & Dalgleish D. G. (2007).** The rennet mechanism coagulation of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *Journal of Colloidal and Interface Science*, 308, 364-373.
- Sang H.K., Ji Y.L., Marilen P.B., Jin-Eung K. , Hyun-Dong P. & Dae-Kyung K. (2017).** Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from bovine skim milk fermented by *Lactococcus lactis* SL6. *Korean Journal of Food Science and Animal Resources*, 37(3), 402-409.
- Sarmadi B.H. & Ismail A. (2010).** Antioxidative peptides from foods proteins. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Sassi E., Attou S., Homrani A. & Nemiche S. (2018).** Effect of the season on the microbiological quality of raw cow's milk on the farm in Western Algeria. *Advances in Bioresearch*, 9(3), 108-122.
- Schlusser J.E., Schmidt S.J. & Speckman R. (1992).** Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 75, 1753-1760.
- Schillinger V. & Lücke F. K. (1989).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environment Microbiology*, 55, 1901-1906.
- Schmidt D.G., Van Der Spek C.A., Bucheim W. & Hinz A. (1974).** On the formation of artificial caseins micelles. *Milchwissenschaft*, 29, 455-459.
- Schmidt D.G. (1980).** Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34, 42-64.
- Schmidt D.G. (1982).** Association of caseins and casein micelle structure; in: « Developments in Dairy Chemistry (Fox P.F.) ». Applied Science Publishers, London.
- Schroeder C.L., Bodyfelt F.W., Wyatt C.J. & McDaniel M.R. (1988).** Reduction of sodium chloride in cheddar cheese: Effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *Journal of Dairy Science*, 71(8), 2010-2020.
- Shahidi F. & Zhong Y. (2008).** Bioactive peptides. *Journal AOAC International*, 91(4), 914-931.
- Sieber R., Bütikofer U., Egger C., Portmann R., Walthier B. & Wechsler D. (2010).** ACE inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 90, 47-73.
- Seifu E., Buys E.M. & Donkin E.F. (2005).** Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications. *Trends Food Science and Technology*, 16, 137-154.

- Settanni L. & Moschetti G. (2010).** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691-697.
- Sforza S., Cavatorta V., Lambertini F., Galaverna G., Dossena A. & Marchelli R. (2012).** Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3514-3526.
- Sicherer S.H. & Sampson H.A (1999).** Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clinical and Experimental Allergy*, 29, 507-12.
- Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B., & Wechsler, D. (2009).** ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 90(1), 47-73.
- Silva S.V., Pihlanto A. & Malcata F.X. (2006).** Bioactive peptides in ovine and caprine cheese like systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89, 3336-334.
- Si-Tayeb A., Mouhous & Cherfaoui L.M. (2015).** Caractérisation de l'élevage bovin laitier en Algérie: cas de la zone de Fréha à Tizi-Ouzou. *Livestock Research for Rural Development*, 27 (7), 1-5.
- Smacchi E. & Gobbetti M. (1998).** Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Enzyme Microbiology and Technology*, 22, 687-694.
- Smit G., Bart A., Wim J.M. (2005).** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS-Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610.
- Sobrinho-López A. & Martín-Belloso O. (2008).** Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329-343.
- Songisepp E., Kullisaar T., Hutt P., Elias P., Brilene T., Zilmer M. & Mikelsaar M. (2004).** A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 87, 2017-2023.
- Souki H. (2009).** Les stratégies industrielles et la construction de la filière lait en Algérie : Portée et limites. *Revue Campus*, 15, 3- 15.
- Spike W. & Freeman A.E. (1967).** Environmental influences on monthly variation in milk constituents. *Journal of Dairy Science*, 50, 1897-1904.
- Sraïri M.T, Ben Salem M., Bourbouze A., Elloumi M., Faye B., Madani T. & Yakhlef F. (2007).** Analyse comparée de la dynamique de la production laitière dans les pays du Maghreb. *Cahiers Agricultures*, 16(4), 251-257.
- Stanisiewski E.P., Mellenberger R.W., Anderson C.R. & Tucker H.A. (1985).** Effect of photoperiod on milk yield and milk fat in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 68, 1134-1140.
- Svetoch E.A. & Stern N.J. (2010).** Bacteriocins control *Campylobacter* spp. In poultry. *Poultry Science*, 98, 1763-1768.
- St-Gelais D. & Tirard-Collet P. (2002).** Fromage, in Science et technologie du lait ; in : « transformation du lait (VIGNOLA C.L.) ». Presses internationales Polytechnique, Canada.

- Suetsuna K., Ukeda H. & Ochi H. (2000).** Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 11, 128-131.
- Sulieman E.A.M., Mohamed Ali R.A. & Abdel Razig K.A. (2012).** Production and Effect of storage in the chemical composition of Mozzarella cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition Enginery*, 3, 21-26.
- Swaisgood H.E. (1993).** Review and update of casein chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76, 3054-3061.
- Tagliazucchi D., Martini S. & Solieri L. (2019).** Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented dairy food. *Fermentation*, 96, 11-34.
- Tang Y.L., Shi Y.H., Zhao W., Hao G. & Le G.W. (2008).** Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacteria membrane. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1187-1194.
- Tauzin J., Miclo L. & Gaillard J.L. (2002).** Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α S2-casein. *FEBS Letters*, 531, 369-374.
- Tesone S. & Quevedo F. (1978).** Contrôle microbiologique du fromage. I. Fromage à pate molle : Le Cuartirolo. *Le lait*, 58, 571-572.
- Thomas L.V., Davies E.A., Delves-Broughton J. & Wimpenny J.W.T. (1998).** Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of Gram-positive bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 1013-1022.
- Thi P.N., Dupas C., Adt I., Degraeve P., Ragon M., Missaoui M., Novelli E., Segato S., The D.P. & Oulahal N. (2013).** Partial characterisation of peptides inhibiting *Listeria* growth in two Alpine cheeses. *Dairy Science and Technology*, 94, 61-72.
- Thierry A., Maillard M.B., Hervé C., Richoux R. & Lortal S. (1998).** Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chemistry*, 87(3), 439-446.
- Timon M.L., Parra V., Otte J., Broncano J.M. & Petron M.J. (2014).** Identification of radical scavenging peptides (< 3 kDa) from Burgos type cheese. *LWT- Food Science and Technology*, 57, 359-365.
- Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. & Slamet S. (1996).** Antimicrobial substance produced By *lactobacillus* sp. TGR-2 isoleted from *Growol*. *Indonesian Food Nutrition and Progress*, 3(2), 29-34.
- Tonouchi H., Suzuki M., Uchida M. & Oda M. (2008).** Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *Journal of Dairy Research*, 75, 284-290.
- Trieu Cuot P. & Gripon J.C. (1982).** A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Journal Dairy Research*, 49, 501-510.
- Trujillo A.J., Ferragut V., Gervilla R., Capellas M., & Guamis B. (1997).** High hydrostatic pressure on milk and milk products. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*, 1, 137-159.

- Tsioulpas A., Lewis M.J. & Grandison A.S. (2007).** Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. *Journal of Dairy Research*, 74, 167-173.
- Upreti P., McKay L.L. & Metzger L. E. (2006).** Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on cheddar cheese quality: Changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *Journal Dairy Science*, 89, 429-443.
- Urbach G. (1995).** Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5(8), 877-903.
- Vajiheh F. (2012).** Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. *Annals of Biological Research*, 3 (5), 2520-2526.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. & Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Van den Berg M.G. (1984).** The thermization of milk. *International Dairy Federation Brussels*, 2, 103-140.
- Van Hylckama Vlieg J.E.T. & Hugenholtz J. (2007).** Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1290-1297.
- Veissyre R. (1975).** Technologie du lait. Maisson rustique, Paris, France.
- Verdini R.A., Zorrilla S.E. & Rubiolo A.C. (2004).** Characterisation of soft cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone. *International Dairy Journal*, 14(5), 445-454.
- Vigui r C., Arora S., Gilmartin N., Welbeck K. & O'kenedy R. (2009).** Review: Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnology*, 27, 486-493.
- Villegas J.M., Picariello G., Mamone G., Turbay M.B.E., Giori G.S. & Hebert E.M. (2014).** Milk-derived angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides generated by *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CRL 581. *Peptidomics*, 1(1), 22-29.
- Vincenzetti S., Polidori P., Mariani P., Cammertoni N., Fantuz F. & Vita A. (2008).** Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry*. 106, 640-649.
- Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S. & Korhonen H. (2007).** Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 106-115.
- Visser S. & Slangen K.J. (1977).** On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine p-casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 16-30.
- Visser S. (1993).** Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350.
- Wakabayashi H., Yamauchi K. & Takase M. (2006).** Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16, 1241-1251.
- Walstra P. (1979).** The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *Journal of Dairy Research*, 46, 317-323.
- Walstra P., Dijk H. J.M. & Geurts T. (1985).** The syneresis of curd. 1. General considerations and literature review. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 39, 209-246.
- Walstra P. (1990).** On the Stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979.
- Walstra P. & Jenness R. (1992).** Casein micelles. In *Dairy Chemistry and Physics*. John: New York, 229-253.

- Walstra P. (1993).** The syneresis of curd; in: « Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (FOX P.F.). Springer, Boston,.
- Wan J., Harmark K., Davidson B.E., Hillier A.J., Gordon J.B., Wilcock A., Hickey M.W. & Coventry M.J. (1997).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), 273-280.
- Whyte D., Walmsley M., Liew A., Claycomb R., Mein G. (2005).** Chemical and rheological aspects of gel formation in the California mastitis test. *Journal of Dairy Research*, 72, 115-121.
- Widyastuti Y., Rohmatus S. & Febrisiantosa A. (2014).** The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 435-442.
- Wilkinson M.G. & Kilcawley K.N. (2005).** Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 817-830.
- Wood P.D.P. (1969).** Factors affecting the shape of the lactation curve in cattle. *Animal Production*, 11, 307-316.
- Woo A.H., Kollodge S. & Lindsay R.C. (1984).** Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 67, 874-878.
- Wouster J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J. & Smit G. (2002).** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.
- Wu H.C., Chen H.M. & Shiau C.Y. (2003).** Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957.
- Yamamoto N., Akino A. & Takano T. (1994).** Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.
- Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S. (2012).** Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB-Express*, 48, 1-12.
- Yoon Y., Lee S. & Choi K. (2016).** Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215.

Annexes

Annexes

Annexe I : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Solutions :

Solution d'acrylamide (A) :

- Acrylamide36 g
- Bis-acrylamide.....1g
- Eau distillée.....100 ml

Tampon de gel de séparation (S) :

- Tris.....18,15 g
- Eau distillée.....100 ml

Ajuster à pH 8,8 avec HCl 4N

Tampon de gel de concentration (C)

- Tris.....6g
- Eau distillée.....100 ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl 4N

Tampon d'électrode

- Tris1,2 g
- Glycine.....5,76 g
- SDS.....0,2 g
- Eau distillée.....200 µl

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris

Tampon d'échantillon

- Solution (C)500 µl
- Eau distillée.....250 µl
- SDS (10%).....250 µl
- 2-mercaptoéthanol.....50 µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon, chauffer à 100 °C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide.

Ajouter 200 µl d'une solution de Glycérol 50 % (V/V) et quelques grains de bleu de bromophénol.

Solution de fixation

- TCA.....12g
- Eau distillée (qsp).....100 ml

Solution de coloration

- Bleu de coomassie R250.....0,5 g
- TCA.....4 g
- Méthanol.....100 ml
- Eau distillée.....100 ml

Solution de décoloration

- Acide acétique.....37,5 ml
- Eau distillée.....312,5 ml
- Méthanol.....150 ml

Solution de persulfate d'ammonium

- Persulfate d'ammonium.....0,1 g
- Eau distillée (qsp).....1 ml

Conduite d'électrophorèse

Préparation du gel de séparation T = 17 % et 2,7 %

- Solution (A).....4,6 ml
- Solution (S).....2,51 ml
- Eau distillée.....2,73 ml

Dégazer le mélange pendant 2 min maximum

- SDS (10%).....100 µl
- TEMED.....13 µl
- Persulfate d'ammonium 10%.....75 µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque

Préparation du gel de concentration : T = 4,8 % et C = 2,7 %

- Solution (A).....1,3 ml
- Solution (C).....2,5 ml
- Eau distillée.....5,8 ml

Dégazer le mélange quelques secondes

- SDS 10%.....100 µl
- TEMED.....20 µl
- Persulfate d'ammonium à 10%.....10µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation puis introduire le peigne.

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 25 V

Fixation : 45 min dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe II : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et al. (1951)

1. Solutions

- **Solution alcaline A** : NaOH, 0,1N dans Na₂CO₃
- **Solution cuivrique B** : CuSO₄, 5H₂O, + Tartrate double de Na et K, 1%.
- **Solution C** : 50 ml de la solution A + 1ml de la solution B.
- **Solution mère de la BSA** : 0,1mg/ml.

2. Gamme étalon

A partir de la solution de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous.

Concentration en BSA µg/mL	0	20	40	80	100
Solution mère de BSA (mL)	0	200	400	80	1000
Eau distillée (mL)	1000	800	600	200	0

3. Méthode

1 ml d'échantillon contenant 100 µg de protéine maximum et 25 µg minimum ;

- ajouter 5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30mn à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

4. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentration en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparée et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration de la protéine inconnue X est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Annexe III : Interprétation du test CMT

Tableau : Interprétation du CMT et correspondance avec le comptage des cellules somatiques (CCS)

Grades	Ecoulement	Description	Cellules /mL (x 10 ³)	Interprétation
Négatif	La cellule se vide goutte à goutte	Absence de flocculat, le mélange demeure liquide	0 à 200	Sain
Traces	La cellule se vide goutte à goutte	Le mélange devient légèrement visqueux, la réaction est réversible et la viscosité tend à disparaître après ±10 secondes	150 à 500	Douteux
1	Le mélange quoique épais se vide graduellement	Le mélange devient visqueux sans formation de gel, la viscosité persiste	400 à 1500	Mammite subclinique
2	La masse gélatineuse qui tombe au début laisse une certaine quantité de liquide dans la cellule	Formation d'un gel adhérent	800 à 5000	Mammite subclinique nette
3	La masse gélatineuse tombe en un seul coup et ne laisse aucun liquide dans la cellule	Gel épais	> 5000	Mammite subclinique sévère

Annexe VI : Résultats d'identification des souches

1. Protocole d'identification d'*E. coli* ATCC 25922 en galeries API 20 E (Biomérieux, France)

La souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922 à identifier doit dans un premier temps être isolée sur un milieu de culture adapté à sa culture. La technique consiste en une utilisation d'un tube contenant d'eau physiologique stérile et puis à l'aide d'une pipette Pasteur on prélève une quantité de colonies pures sur milieu gélosé et de préférence on utilise des cultures jeunes (18-24 h).

On réalise une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu et puis on introduit la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation des bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant).

Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir le tube et la cupule. Pour les autres tests remplir uniquement les tubes (et non les cupules). Les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE nécessitent une anaérobiose en remplissant leur cupule avec d'huile de vaseline. Après avoir préparée la galerie API20E, renfermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C.

Après l'incubation des galeries API 20 E pendant 24 h à 37 °C, la lecture des résultats se fait en utilisant le tableau N°1 et puis faire rentrer ces données dans le logiciel associé pour faire sortir la référence ATCC de l'entérobactérie (logiciel utilisé est API WEB, disponible au niveau de laboratoire de microbiologie médicale du CHU de Tizi-ouzou).

Figure 1 : Résultats de test biochimiques sur galerie API 20E

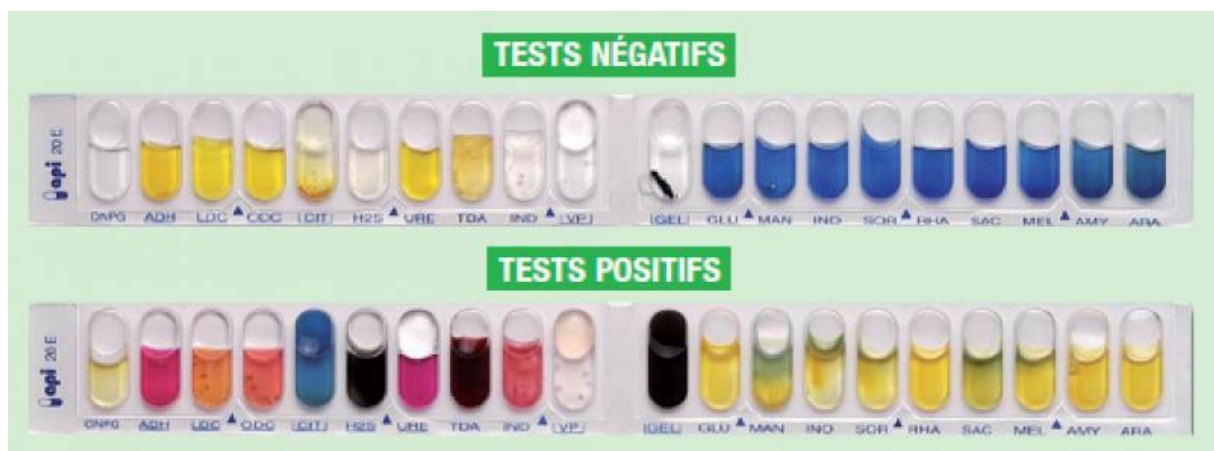


Tableau : Critères d'interprétation des résultats de la Galerie API 20E

Tests	Composants actifs	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négatifs	Positifs
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	jaune (1)
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	rouge/orangé (2)
LDC	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	rouge/orangé (2)
ODC	L-ornithine	OrnithineDéCarboxylase	Jaune	rouge/orangé (2)
CIT	trisodium citrate	utilisation du CITrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/bleu (3)
H₂S	sodium thiosulfate	production d' H ₂ S	incolore/grisâtre	dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	rouge/orangé (2)
TDA	L- tryptophane	Tryptophane DésAminase	TDA/immédiat	
			Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L- tryptophane	production d'INDole	JAMES/immédiat	
			Incolore vert pâle/jaune	Rose
VP	sodium pyruvate	production d'acétoïne (VogesProskauer)	VP1+VP2/10 min	
			Incolore/rose pâle	rose/rouge (5)
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	fermentation/oxydation (GLUcose) (4)	bleu/bleu vert	jaune/jaune gris
MAN	D-mannitol	fermentation/oxydation (MANnitrol) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	fermentation/oxydation (INOsitol) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxydation (SORbitol) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxydation (RHAmnose) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-saccharose	fermentation/oxydation (SACcharose) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D-melibiose	fermentation/oxydation (MELibiose) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	fermentation/oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	fermentation/oxydation (ARAbinose) (4)	bleu/bleu vert	Jaune

2. Résultats d'identifications des souches

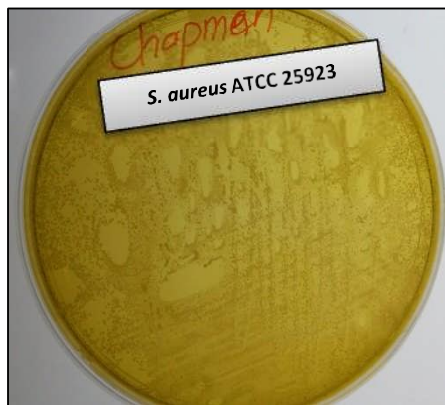


Figure 2 : Aspects des souches sur milieux de cultures

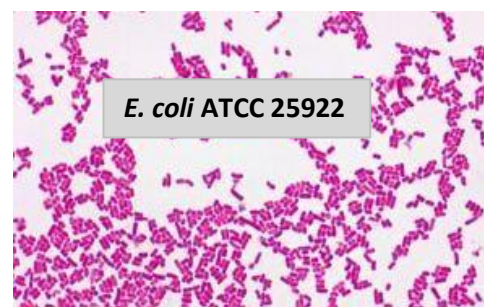
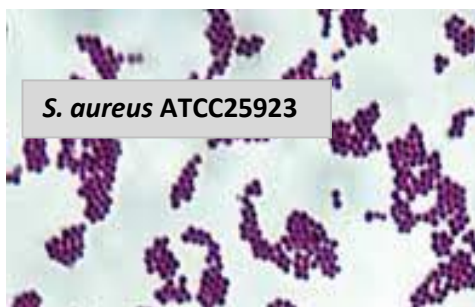
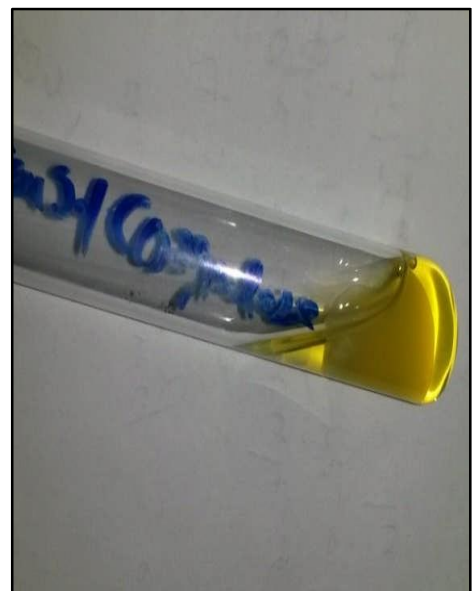


Figure 3 : Colorations de Gram des Souches utilisées



Avant

Après

Figure 4: Résultats du test coagulase pour test de confirmation *Staphylococcus aureus*.

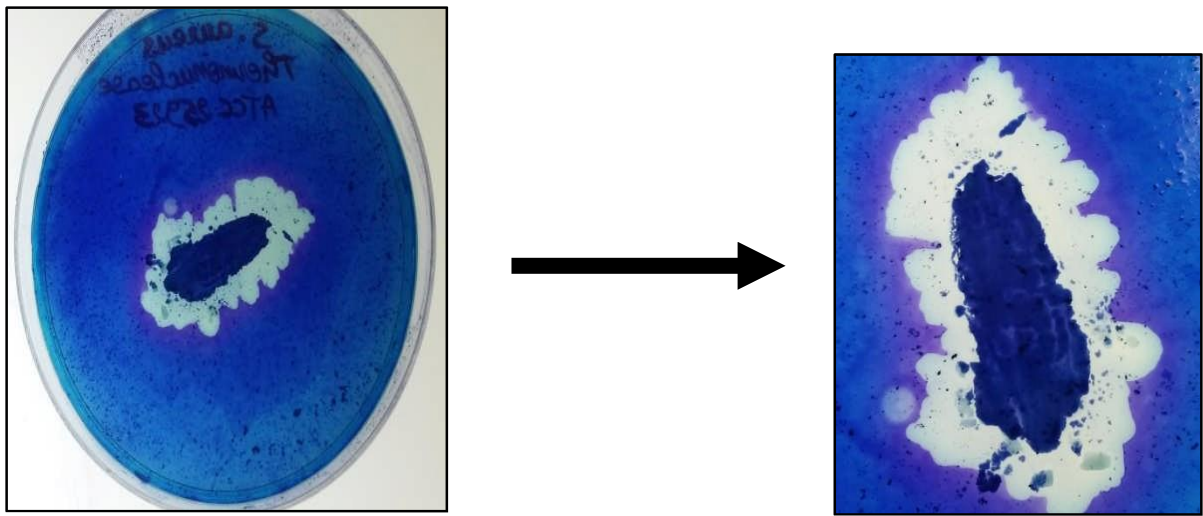


Figure 5: Recherche d'une ADNase thermorésistante caractéristique de l'espèce *S. aureus*

Annexe VII : Résultats des taux d’inhibition des souches cibles avec les fractions hydrosolubles (brut et neutralisé) du Camembert artisanal

Extraits		<i>E. coli</i> Temps d’incubations (heure)											
Témoin (DO620nm)	MOY	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
		0,009±0,00163	0,04 ±0,0090	0,36±0,024	0,7±0,014	0,73 ±0,0163	0,79±0,0081	0,84±0,042	0,85±0,017	0 ,87±0,0081	0,85±0,021	0,87±0,019	0,88±0,008
	MOY	0,009±0,0027	0,02±0,0029	0,24±0,023	0,26±0,021	0,26±0,0141	0,24±0,037	0,2±0,0081	0,2±0,016	0,2±0,0081	0,23±0,049	0,186±0,032	0,18±0,037
Brut(DO620nm)	%INHIB	0	50	33,33333333	62,85714286	64,38356164	69,62025316	76,19047619	76,47058824	77,01149425	72,94117647	78,5440613	79,54545455
Neutralisé Exempt H ₂ O ₂ (DO620nm)	MOY	0,009±0,0057	0,017±0,0078	0,15±0 ,021	0,24±0 ,05	0,22±0,021	0,21±0,057	0,19±0,026	0,18±0,042	0,18±0,063	0,18±0,037	0,18±0,028	0,17±0,049
	%INHIB	0	57,5	58,33333333	65,71428571	69,8630137	73,41772152	77,38095238	78,82352941	79,31034483	78,82352941	79,31034483	80,68181818

Extraits		<i>S. aureus</i> Temps d’incubations (heure)											
Témoin (DO620nm)	MOY	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
		0,0054±0,0011	0,099±0,0128	0,2±0,0294	0,28±0,0575	0,31±0,0141	0,58±0,139	0,7±0,0216	0,82±0,016	0,85±0,0356	0,88±0,06	0,91±0,065	0,92±0,028
	MOY	0,0044±0,0011	0,07±0,018	0,17±0,0294	0,2±0,021	0,3±0,08	0,29±0,0432	0,27±0,058	0,26±0,00816	0,26±0,049	0,24±0,022	0,24±0,043	0,22±0,018
Brut(DO620nm)	%INHIB	18,518519	29,29293	15	28,57143	3,22581	50	61,4286	68,2927	69,412	72,7	73,63	76,09
Neutralisé Exempt H ₂ O ₂ (DO620nm)	MOY	0,005±0,0020	0,098±0,007	0,12±0,0216	0,26±0,029439	0,31±0,01414	0,29±0,08641	0,28±0,03742	0,28333±0,04028	0,25±0,0432	0,21±0,02	0,2±0,016	0,2±0,022
	%INHIB	7,4074074	1,010101	40	7,142857	0	50	60	65,4472	70,588	76,1	78,02	78,26

Valorisation

RESEARCH ARTICLE

Microbiological and physicochemical changes during ripening of Camembert cheeses made from raw and pasteurized cow milk produced in Tizi-Ouzou (north of Algeria)

Hillal Sebbane¹, Dalila Almi¹, Sonia Hadouchi², Louiza Hedjel², Noria Smail-Saadoun³ and Abderrahmane Mati¹

Received: 01 August 2020 / Accepted: 10 November 2020 / Published online: 28 February 2021
© Indian Dairy Association (India) 2021

Abstract: This study was carried out on two types of Camembert produced in the region of Tizi-Ouzou (northern Algeria), one artisanal (AC) made from raw milk and the other industrial (IC) made from pasteurized milk. This work shows the effect of milk quality and cheese making processes on the progress of physicochemical and microbiological parameters throughout a maturation period of 12 days. The result shows that the repining microflora and undesirable microbial populations were significantly higher ($P < 0.05$) in the artisanal Camembert (AC) than in the industrial Camembert (IC). The physicochemical and microbiological parameters, during the ripening of the cheeses developed in a similar way with significant differences according to the type and the stage of maturation. During the cheese repining period, AC showed more extensive ($P < 0.05$) lipolysis and proteolysis than IC. SDS-PAGE of water-soluble proteins (WSP) and insoluble fractions showed more extensive degradation of α s-casein (α s-CN) than β -casein (β -CN). The WSP profile, analyzed by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), was highest in AC than IC. The highest WSP profile was recorded at the 12th day of repining. The pathogenic flora decreased during the maturation process in AC. This development was confirmed by the results of the antibacterial effect of WSP, performed by the disc diffusion

technique on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. From this study, it can be concluded that AC has a better organoleptic quality, safe for the Algerian consumer and more profitable for the Algerian cheesemakers

Keywords: Algeria, Camembert, Cheese ripening, Lipolysis, Proteolysis, Raw and pasteurized milks

Introduction

Since the early 1990s, Algeria has implemented a dairy policy in order to enhance the value of local production from cattle breeding (Mamine et al. 2011). With the launch of the National Agricultural Development Plan (NADP) in 2000 and its extension to rural areas, total milk production increased from 1.9 billion liters in 2004 to 3.3 billion in 2018, covering about 60% of national milk needs. This production, even if it faces an insufficient collection circuit (Kali et al. 2011), has enabled some artisanal dairy farmers to process milk into raw milk cheese production. Nevertheless, this approach is quite innovative in Algeria and the microbiological and physicochemical characterization of raw milk cheeses is attracting the interest of public authorities and researchers (Aissaoui et al. 2011; Meribai et al. 2017). Indeed, hygiene requirements have become an important consideration in the production of artisanal cheeses, particularly those with a protected designation of origin (PDO), which are produced with raw milk, such as Camembert de Normandie (France), often produced in mountain areas (Gérard, 2015).

Traditional cheese making, especially for the Camembert, is distinguished from the industrial production by various aspects, and the better organoleptic qualities are obtained with the raw milk (Richard and Zadi 1983). Organoleptic properties are mainly influenced by the growth of lactic acid bacteria and the combined effect of proteolysis and lipolysis on the cheese matrix during the ripening process (Gebreyowhans et al. 2020). The release of bacteriocins and bioactive peptide fractions, endowed with antibacterial activities, inhibit bacterial pathogens (Mane and McSweeney, 2019), such as *Listeria ssp.* in the case of Camembert (Wan et al. 1997). This is how we set out to evaluate the quality of two soft cheeses, one made from raw milk and the other from pasteurized milk. We particularly explored the physicochemical

¹Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou, Algeria

² Faculty of Biological Sciences and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou, Algeria

³Natural Resources Laboratory, Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou, Algeria

Hillal Sebbane (✉)
Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB),
Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou, Algeria
Email: hillalmicrobio@yahoo.com

and microbiological characteristics of these cheeses at different stages of the ripening process and demonstrate the safety of raw milk cheeses, especially Camembert, in Algeria. To the best of our knowledge, this is the first study to assess the antimicrobial effect of water-soluble peptide fractions extracted from Camembert.

Materials and Methods

Sampling procedure and cheesemaking

The samples of milk used for the production of Camembert, came from two farms in the region of Tizi-Ouzou. The farms are made up of cows of dairy cattle breeds (Holstein and Montbéliard), with an average age of 4 to 8 years and they are at the same stage of lactation. The maturing period is set at 12 days, with reference to Algerian industrial practices. Two types of Camembert, one artisanal, the other industrial, produced in the region of Tizi-Ouzou (northern Algeria), were selected within the framework of this study. The analyses were based on 108 samples from each Camembert type and on 27 samples from each kind of milk (raw and pasteurized). The sampling of the products were carried from March to June during the period 2014-2016, in order to avoid the seasonality effect on the physicochemical and microbiological composition of the milk. Three samples per month were collected from each milks (raw and pasteurized milk) and cheeses at four ripening stages: first, fourth, sixth and twelfth days (Table 1). Placed in a cooler, the samples were directly taken to the laboratory and the analyses were performed during the following 24 hours.

The moulding of the cheeses (AC and IC) was performed into polyurethane perforated moulds (cylinders 10 to 11 cm in diameter and 13 to 14 cm in height). Demoulding of cheeses (AC and IC) is carried out when the lactic acidity of the curd reaches values of 9.5 to 11% (w/w) and a pH of 4.5 to 4.9.

The artisanal Camembert (AC), made from raw milk, was produced in the locality of Ouacif (Tizi-Ouzou, Algeria) by an artisan

cheesemaker breeding dairy cattle under extensive holding conditions and transforms milk to Camembert according to the guidelines of the French legislation related to cheeses and cheese specialties (Art. 9 and 14 of the decree n° 2013-1010 of the 12th of November 2013). Milk was heated up to 35 °C till it reaches an acidity of 22 to 25 °D (2.2 to 2.5 g/l of lactic acid) or at pH 6.30 to 6.35, before a liquid rennet (standard strength of 1:10000, Halal calf Rennet, Chr. Hansen Inc., Danemark) was added (15-20 ml/100 L of milk). After coagulation (1h10 min-1h30 min), the moulding of the cheese was performed directly with a ladle into polyurethane perforated moulds, without stirring the curd, at a rate of 5 ladles per mould, with a rest period of 15 to 20 minutes between each ladle, without stirring the coagulum. Draining was done on stainless drains (24 to 48 h, 25-28 °C) at a relative humidity (RH) of 95%, turning the cheese every five hours, before it was worked with sprinkling of fine salt. Then, the cheese (AC) was sprayed with a solution of *Penicillium camemberti* spores (2×10^4 spore/ml) and ripened during 12 days at a temperature of 10 to 12 °C and a RH of 90 to 95%, with a rotation every two to three days.

The industrial Camembert (IC), made from pasteurized milk, was produced in a cheese dairy located in Draa Ben Khedda (Tizi-Ouzou), which was supplied with milk from a close locality (Freha, Tizi-Ouzou). Without undergoing any standardization of fat and protein contents, milk is first pasteurized at 90 °C for 20 seconds and then cooled to 36 °C. After adding CaCl_2 (15-20 g/100 L of milk), milk was seeded with mixed lactic ferments (Mesophilous: DI-PROX M 229, BioProx, France/Thermophilous: DI-PROX TPM 2, BioProx, France) with 0.03% of fungal flora (Chr. Hansen Inc., Danemark) of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* in order to reach the final concentrations of 10^4 spores/ml and 2×10^4 spores/ml, respectively. After the fermentation period of milk (20-25 minutes at 36°C), the pH reached a value of 6.35, commercial rennet fungal powder Marzyme™ (standard strength of: 150000, Danisco. France) was added (1.5 g/50 Kg of milk), then the coagulum is divided into small cubes ($\varnothing = 30$ mm). To accelerate draining, the coagulum was stirred twice during 15 minutes with an interval of five minutes. The whey was evacuated by pumping it out, then the moulding was carried out by

Table 1 Distribution of the samples according to the kind of the milk and the ripening stage

Sample	Ripening days	Sampling plan									Total number of samples
		1 st year			2 nd year			3 rd year			
		1 st month	2 nd month	3 rd month	1 st month	2 nd month	3 rd month	1 st month	2 nd month	3 rd month	
Artisanal or industrial camembert	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
	12	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27
Total samples of Camembert at all stages of cheese repining											108
Raw or pasteurized milk		3	3	3	3	3	3	3	3	3	27

mechanically filling the moulds. The coagulum is drained in polyurethane molds placed on stainless drains during 15 to 20 hours at RH of 90 to 95% (27 °C-5 h and 20 °C-15 h), with rotations every five hours. After it was removed from the mold, the cheese was salted by brining (NaCl = 40%, pH = 4.5) during 30 to 60 minutes at 13 °C. The cheese surface was dried in a draining room during 15 hours (14 °C, RH = 85 %) with two rotations. Then, it was sprinkled with a suspension of *Penicillium camemberti* spores (2.10⁹ Spore/ml) (Chr. Hansen Inc., Denmark) and ripened during 12 days (12-13 °C, RH = 90-95 %) with a rotation every two to three days.

Physicochemical analysis

Physicochemical parameters during cheese ripening were analysed after removing the cheese crust. Samples of milk were analyzed with Lacto-scan SP (Milkotronic LTD, Bulgaria) for density, fat and proteins). The pH was measured by immersing the pH-meter glass electrode (Hanna-instrument, Italy) directly in the products (cheeses and milks) (Bouton et al. 1994). The titratable acidity (TA) of the milk was expressed in Dornic degree (°D) (AFNOR, 1980) and as % of lactic acid for the cheese (Suliman et al. 2012). The dry-matter (DM) was determined using an infrared desiccator IR35 (Denver instrument, Germany) by evaporation (105°C/20 min) of 3 g of milk (AFNOR, 1980) or 5 g of cheese (Randoin and Jourdan, 1952). The Fat content of cheese was determined by Van-Gulik butyrometer (Funkgerber Instrument, Germany) (JORADP, 2014).

Protein fractionation

Protein concentration was determined using the Lowry protein procedure at 750 nm with Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Lowry

et al. 1951). Bovine Serum Albumin was used as a standard. From slurry prepared from by mixing 20 g of cheese (crust removed and crushed) in 40 ml of sodium citrate buffer (0.5 M, pH 7), three protein fractions, which are the total protein content (TP), the acid soluble protein (ASP) and the non-protein nitrogen (NPN), were obtained by combining the methods reported by Gripon et al. (1975) and Guerra-Martinez et al. (2012).

Free amino acids

Total levels of free amino acids (FAA) in the pH4.6-Soluble fractions of the cheese were determined by the 2, 4, 6, trinitrobenzene-1-sulfonic acid (TNBS) method described by Polychroniadou (1988) modified by Bouton et al. (1993). Cheese extracts were prepared, as mentioned above. The use of a range of glycine standard (0.01-0.5 mM) allowed expressing the measurements in mEq glycine/g of protein.

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Proteolysis during cheese ripening from the water-soluble proteins (WSP) and insoluble protein fractions at pH 4.6 was evaluated by SDS-PAGE (Barac et al. 2016). The fractions were prepared according to the techniques reported by Dupas et al. (2009). The PAGE-SDS was performed according the method described by Laemmli (1970). A marker kit was for bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), β-Lactoglobulin (18 kDa) and α-Lactalbumin (14 kDa).

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) of the cheese solutions water-soluble fractions

The proteolysis during cheese ripening was also assessed by RP-HPLC. Samples of WSP (3 mg/ml) were prepared in a Bis-Tris

Table 2 Milk and cheese microbial flora enumerated during ripening

Microflora	Culture medium	Incubation
Aerobic mesophilic flora (AMF)	PCA-Agar	30°C/24-72 h
Total coliforms (TC)	VRBL agar	30°C/24-48 h
Faecal coliforms (FC)		44°C/24-48 h
Faecal streptococci (FS)	BEA (bile esculineazide) agar followed by catalase and Gram reactions, growth at 37° C and at 6.5% NaCl in BHI	37° C/24-48 h
Mesophilic lactobacilli (MLAB)	MRS agar followed by a catalase test and a Gram stain	30°C/24-48 h
Mesophilic lactic <i>Streptococcus</i> (MLS)	M17 agar followed by a catalase test and a Gram stain	30°C/24-48 h
Yeast and molds (Y-L)	OGA agar	22°C/3-7 d
<i>Staphylococcus aureus</i>	Presumptive testing: Giolitti-Cantoni broth Confirmatory test: Baird Parker agar with the coagulase test	37°C/48 h
<i>Salmonella</i> spp. (samples: 25 ml for milk or 25 g for cheese)	Enrichment on SFB broth and isolation on Hektoen agar	37 °C/48 h

buffer with a pH 8 and filtered through 0.45 µm nylon filters (Sartorius, Germany). Twenty µl of filtrate was injected in a Lichrosorb C8 column (5 µm, 125x4, 1mm). The mobile phase was constituted by a solvent A (10% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid: TFA) and a solvent B (60% acetonitrile, 0.02 % TFA). The elution was performed using a 0-50% binary gradient of the solvent B during 50 minutes with a flow rate of 0.2 ml/min at 35 °C. The detection was performed under UV at 214 nm.

Lipolysis

The lipolysis was assessed by measuring the amount of free fatty acids (FFA_s) according to the method described by Deeth et al. (1975). The FFAs were expressed in equivalent of oleic acid per 100 g of fat, referring to a standard curve of oleic acid (0.10-10 mg/ml).

Microbiological analysis

Milk and cheese microflora during ripening were determined by the conventional techniques for which the incubation conditions and the medium used are reported in Table 2. Cheese samples were collected at 1, 6 and 12 days of ripening. The dilutions were prepared either directly from milk or from cheese prepared according the method described by Lenoir (1963) after some modifications. After removing the crust, 10 g samples of cheese were homogenized in a Stomacher 400 (Seward Medical, Londres, UK) with 90 ml of sterile sodium citrate (2%) at 40 °C. Decimal dilutions of milk and cheese solution were prepared with Ringer's solution. Germ counts were expressed according to the formula of Joffin and Joffin (1999).

Anti-microbial activity of water-soluble extract

The raw water-soluble extracts (WSE) were extracted at the 12th day of cheese ripening, as mentioned above (fractionation of WSP), without acidification. In order to eliminate the antagonistic effects of the pH and H₂O₂, the WSE was neutralized to pH 6.8 with NaOH (2N) and after addition of few drops of catalase (1 mg/ml), it was incubated for one hour at 30 °C (Sahraoui et al. 2015). The raw WSE and the neutralized WSE were filtered through 0.22 µm filters. The agar-disc diffusion assay was performed according to protocol reported by Motta and Brandelli (2002).

Table 3 Physicochemical compositions of the milk

Composition	Raw milk	Pasteurized milk
pH	6.69 ^a ±0.02	6.66 ^a ±0.06
TA(°D)	17 ^a ±0.93	15.66 ^a ±0.41
Densité	1.03 ^a ±0.01	1.027 ^a ±0.7
DM (g/l)	122.1 ^b ±0.3082	108.13 ^a ±2.31
FAT (g/l)	33.66 ^a ±2.16	36 ^a ±0.61
TP (g/l)	29.45 ^b ±0.09	26.66 ^a ±0.41

Results in the same column for the same parameter with different superscripts are significantly different at P < 0.05.

The antibacterial activity was tested against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. All the strains were standardized by spectrometry (620 nm) at an optical density (OD) of 0.08-0.1, according to the AntibioGram Committee CASFM/EUCAST (2019).

Aliquots of 20 µl were applied on five discs (6 mm): two discs of the raw WSE, two discs of neutralized WSE and one disc with broth (as negative control). The Petri dishes were placed in a refrigerator at 4 °C for two hours. The antimicrobial effect of WSE (expressed in mm) was examined after incubation for 24 hours under appropriate culture conditions. Three replicates were performed on different dates.

Statistical analysis

The physicochemical composition and microbiological counts, between raw milk and pasteurized milk, were assessed by the Student's t-test (5% level of significance). An Analysis of variance (ANOVA), using the Tukey test for pair wise comparison of means, was performed (significant level of 5 %), to follow the changes in the physicochemical and microbiological parameters during cheese ripening. A principal component analysis (PCA) was run in order to analyze the effect of the ripening stage on the physicochemical and microbiological interactions during cheese maturation. The statistical analyses were performed using STATbox software ver. 6.4.

Results and Discussion

Physicochemical characteristics of milk

The milk physicochemical characteristics are reported in Table 3. Among the analyzed parameters, significant difference was only found between the DM and milk TP (P < 0.05). The sampling season can affect the physico-chemical and microbiological quality of milk (Spike and Freeman, 1967; Nalepa et al. 2018). The effect of seasonality was discarded in this study, as sampling occurred during the same periods of the year.

Changes in physicochemical parameters during ripening

The statistical analyses of the physicochemical parameters (Table 4) showed significant differences (P < 0.05) depending on the stage of ripening and the type of cheese.

The pH is negatively correlated with titratable acidity between the different cheese types and the ripening stages. From the first to the twelfth day of ripening, the pH values increased from 4.59 and 4.67 (IC) to 5.13 and 5.36, respectively. This is due to the deacidification of the cheese, which is better assessed through measuring the titratable acidity. Indeed, cheese acidity decreased between the first day (9.59% for the artisanal cheese and 9.11% for the industrial) and the last day of ripening (5.83% artisanal cheese and 6.17% for the industrial)

In the case of Camembert the neutralization and deacidification of cheese is due to the assimilation of lactic acid and the releasing of NH_3 by the fungal flora, especially *Penicillium camemberti* and *Geotichum candidum*, which promoted the action of proteolytic enzymes and increased the proteolysis index (ASP%, NPN%, and FAA) (Leclercq-Perlat et al. 2004).

Dry Matter increased during ripening with significant differences between the stages and the cheese types. The values range from 39.40% (AC) and 40.89% (IC) at the first day, to 50.09% (AC) and 49.51% (IC) at the 12th day of ripening. These findings may be attributed to the dehydration during cheese ripening. This phenomenon is caused by water loss and exchanges in volatile compounds (ammoniac, fat volatile fatty acids, etc.) between the cheese surface and the ripening room environment (Bertolino et al. 2011). The dehydration of cheese affects the contents of DM, fat and protein during ripening process. Indeed, at the last ripening day, the fat content reached at 25.99% for the AC and

28.75% for the IC and the protein contents attained 15.25% for the AC and 17.20% for the IC.

Progress of proteolysis and lipolysis during ripening

The proteolysis index, ASP/TP (ASP %) and NPN/TP (NPN %) ratios, have been used by many authors as cheese ripening indicators in order to estimate the degree of the proteolysis (Leclercq-Perlat, 2000). Statistical analysis showed significant differences between the types of cheeses and stages of ripening. ASP% increased from the first to the twelfth day of ripening, with the following values respectively: 5.22% to 22.24% for AC and from 4.69% to 17.44% for IC. The non-protein nitrogen values also increased from 0.310% to 0.44% for AC and from 0.22% to 0.28% for IC. The results of the free amino acids contents during cheese ripening, revealed significant differences ($P < 0.05$) between the cheeses. Free fatty acids increased from 0.12 (first day) to 0.25 (12th day) for AC and from 0.09 (first day) to 0.23 (12th day) for IC. The combined effect of the microflora and indigenous enzymes of the raw milk explains the high degree of the proteolysis in AC. The action of intracellular enzymes, released during cell lysis, on the proteolysis of the cheese caseins has been reported by Saboya et al. (2001). The heat treatment of milk slows down cheese proteolysis by modifying the total flora and the proteolysis system during cheese ripening, such as the Camembert (Samelis et al. 2009). The proteolysis activity of the plasmin in ripened cheeses depends on the technology applied in milk processing. The effect of plasmin on caseins of cheese made from pasteurized

Table 4 Changes in physicochemical parameters during ripening of artisanal and industrial cheeses

Physico-chemical parameters	Cheeses	Ripening period (days)			
		1	4	6	12
pH	Artisanal ^A	4.59 ^a ± 0.38	4.60 ^a ± 0.49	4.90 ^{ab} ± 0.35	5.13 ^{ab} ± 0.38
	Industrial ^B	4.67 ^{ab} ± 0.53	4.94 ^{ab} ± 0.42	5.28 ^{ab} ± 0.4	5.36 ^b ± 0.46
TA (g/100g of cheese)	Artisanal ^B	9.59 ^f ± 0.18	8.70 ^{de} ± 0.43	8.06 ^{cd} ± 0.42	5.83 ^a ± 0.23
	Industrial ^A	9.11 ^e ± 0.64	7.90 ^c ± 0.39	7.04 ^b ± 0.52	6.17 ^a ± 0.22
DM (g/100 g of cheese)	Artisanal ^A	39.40 ^a ± 2.49	41.84 ^a ± 4.46	48.11 ^b ± 4.48	50.09 ^c ± 2.57
	Industrial ^A	40.89 ^b ± 4.61	42.61 ^b ± 3.41	47.11 ^{cd} ± 2.59	49.51 ^d ± 2.98
FAT (g/100 g of cheese)	Artisanal ^A	18.76 ^a ± 0.82	20.15 ^a ± 0.68	23.71 ^b ± 0.77	25.99 ^c ± 0.44
	Industrial ^B	22.95 ^b ± 1.53	23.61 ^b ± 1.92	27.11 ^{cd} ± 1.59	28.75 ^d ± 1.64
TP (g/100g of cheese)	Artisanal ^A	10.01 ^a ± 1.34	12.07 ^b ± 1.55	14.19 ^c ± 0.63	15.25 ^c ± 0.67
	Industrial ^B	12.17 ^b ± 0.32	14.27 ^c ± 0.77	15.29 ^c ± 0.85	17.20 ^d ± 0.78
APS-PT (g/100g of TP)	Artisanal ^B	5.22 ^a ± 0.55	5.52 ^a ± 0.53	12.49 ^b ± 0.59	22.24 ^c ± 2.87
	Industrial ^A	4.69 ^a ± 0.27	4.63 ^a ± 0.33	6.97 ^a ± 0.42	17.44 ^c ± 2.85
NPN-PT (g/100 g of TP) %	Artisanal ^B	0.31 ^b ± 0.07	0.34 ^b ± 0.06	0.42 ^c ± 0.03	0.44 ^c ± 0.04
	Industrial ^A	0.22 ^a ± 0.03	0.22 ^a ± 0.03	0.21 ^a ± 0.03	0.28 ^{ab} ± 0.05
FAA(mEq glyc/g TP)	Artisanal ^A	0.12 ^{ab} ± 0.03	0.14 ^{bc} ± 0.01	0.18 ^{cd} ± 0.02	0.25 ^c ± 0.02
	Industrial ^B	0.09 ^a ± 0.004	0.13 ^{ab} ± 0.003	0.21 ^{cd} ± 0.03	0.23 ^d ± 0.014
FFA (Eq Oleic acid/100g of FAT)	Artisanal ^B	0.90 ^a ± 0.31	2.04 ^c ± 0.006	2.61 ^d ± 0.38	3.19 ^c ± 0.18
	Industrial ^A	0.99 ^a ± 0.11	1.22 ^{ab} ± 0.14	1.28 ^{ab} ± 0.007	1.40 ^b ± 0.23

Results in the same row or column for the same parameter with different superscripts (in upper case or lower case) are significantly different at $P < 0.05$

Fig. 1 RP-HPLC water soluble peptide (WSP) fractions from AC and IC at different periods of cheese ripening (1, 6 d and 12 days)

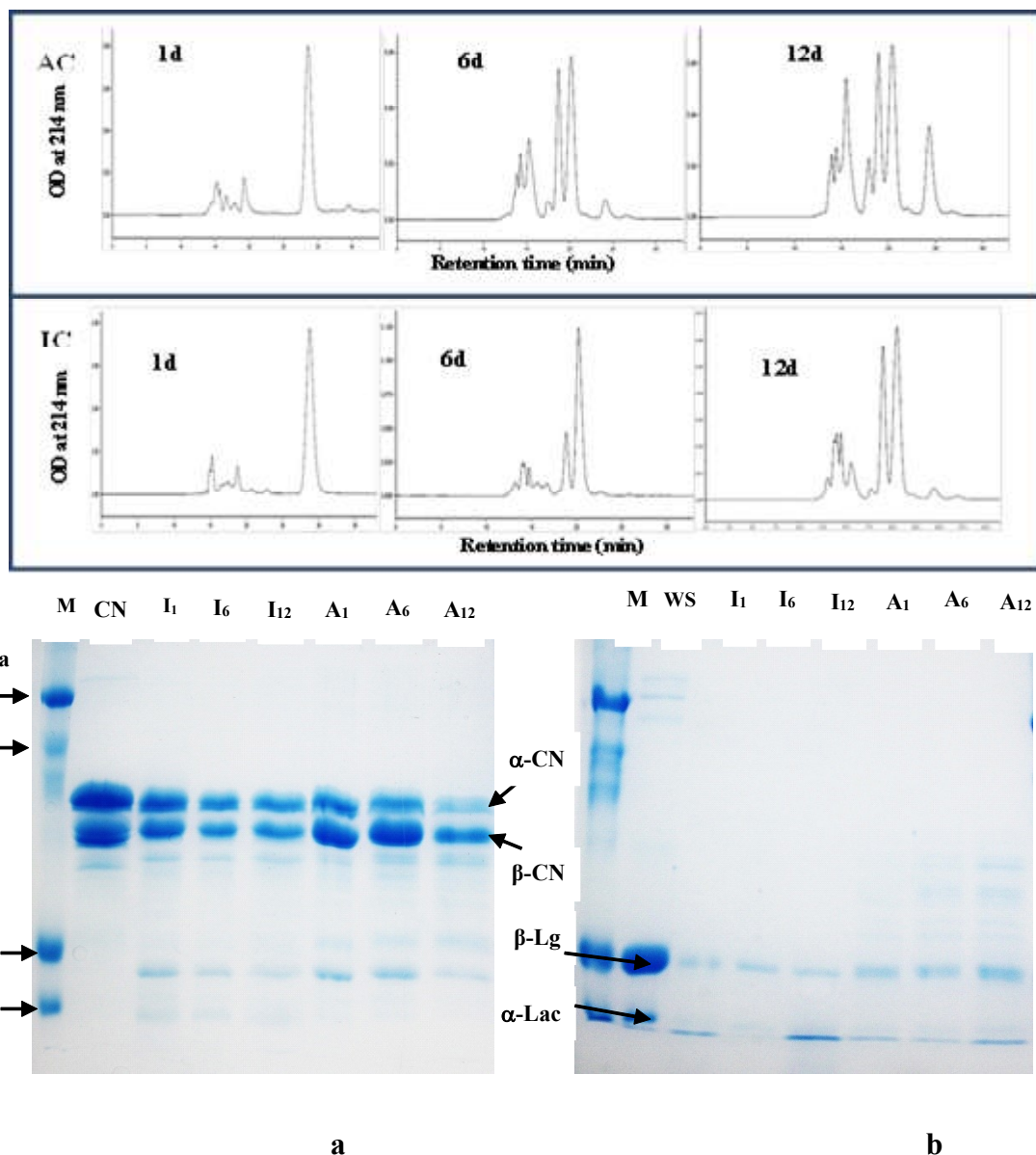


Fig. 2 SDS-PAGE electrophoretic profiles of the insoluble (a) and WSP (b) fractions at pH 4.6 of AC and IC at different days of ripening (1, 6 and 12 days)

milk, decreases significantly with increasing temperatures (Benfeldt et al. 1997; Buffa et al. 2000). The action of the rennet, the plasmin, the proteases and the microbial peptidases on the caseins throughout ripening releases peptides and amino acids, which increases the ripening index: ASP%, NPN% and FAA % (Gonzalez et al. 2003; Upreti et al. 2006; Orlyukand Stepanishchev, 2014).

Free fatty acids during cheese ripening, increase as does the proteolysis and the fat content. Similar results have been reported by Batool et al. (2018). FFA presents significant differences between the stages and the types of cheeses. The high level of FFA in the AC can be explained by the micro floral composition

of raw milk and the lipoprotein lipase activities. Indeed, the negative effect of pasteurization on LPL activities and the highest of lipolysis degrees in cheeses made from raw milk compared to those made from pasteurized milk have been reported by several authors (McSweeney et al. 1993; Franco et al. 2001).

RP-HPLC profiles

The RP-HPLC profiles of WSP of the two cheeses, showed an increase in the number of peaks during the ripening process (Figure 1). These peaks were more frequent in AC than in IC. This is due to the high level of proteolysis in AC, the proteolysis activity of the indigenous milk enzymes, the microbial enzymes

as well as the activity of the residual rennet. The heat treatment has a negative effect on the proteolysis process during cheese ripening. Benfeldt and Sorensen (2001) showed an inverse relationship, during cheese ripening, between the temperature of heat treatment of milk and the proteolysis as followed by an RP-HPLC. According to Trujillo et al. (1997) and Van Hekken et al. (2007), most of the peptides which are released during ripening, are generated from the caseins hydrolysis by rennet and plasmin with a molecular weight ranging from 10 to 20 kDa.

Electrophoresis of WSP and insoluble proteins fractions

The figure 2_a, shows that the indigenous casein migrates as two main bands corresponding to α s-CN and β -CN. The band intensity decreased throughout ripening, leaving two new bands of low molecular weight (Figure 2_b).

This trend was most pronounced for AC at the 12th day of ripening. These profiles revealed that the caseins proteolysis changes over time and with the type of the cheese, with higher α s-CN proteolytic rates than with β -CN. Indeed, new bands with lower molecular weight and the increase in peaks of WSP obtained with RP-HPLC, explain the higher proteolysis index and the free amino acids rates observed in AC than in IC. Our findings are consistent with those reported by Gobetti et al. (2002), who noted that chymosin hydrolyzes easily α s₁-CN than β -CN, releasing a peptide identified as α s₁-I-casein f(24-199). Chymosin is also able to hydrolyze β -CN (Addeo et al. 1980). The main cleavage site of chymosin in β -CN is Leu¹⁹²-Tyr¹⁹³. However, in pure solution, it can hydrolyze β -CN at seven sites, generating f1-192, f1-189, f1-163/4/5 et f1-139 peptides, which are called - β -I^I, - β -I^{II}, - β -II and - β -III respectively (Visser, 1993). Orlyuk and Stepanishvhev (2014) reported that between the first and the 21st days of the Camembert ripening, the content of α s-CN and β -CN decreased respectively, by 53% and 25%. Proteolysis during the Camembert ripening is mainly due to the action of five proteinases: rennet (chymosin and pepsin), plasmin, aspartyl and methaloprotease of *Penicillium caseicolum*. However, the rennet seems to be inactive on β -CN, but acts early on α s₁-CN with a similar action to that of aspartyl-proteinase on α s₁-CN. On the contrary, the action of the plasmin on β -CN is observed at the 21st day, while the proteolysis of β -CN by the aspartyl and by the

methaloproteases is detectable after seven and ten days of ripening respectively (Mane and McSweeney, 2019).

Growth of microflora during ripening

The results of milk microorganism counts are reported in table 5. The samples comply with the standards described in the Official Journal of the People's Democratic Republic of Algeria n° 39 of July 2017 (JORADP, 2017). The tests to detect pathogens in the milks and the cheeses, especially for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*, were negative. The number of microorganisms is significantly higher in the raw milk than in the pasteurized. This reflects the lethal effect of the pasteurization on milk microflora.

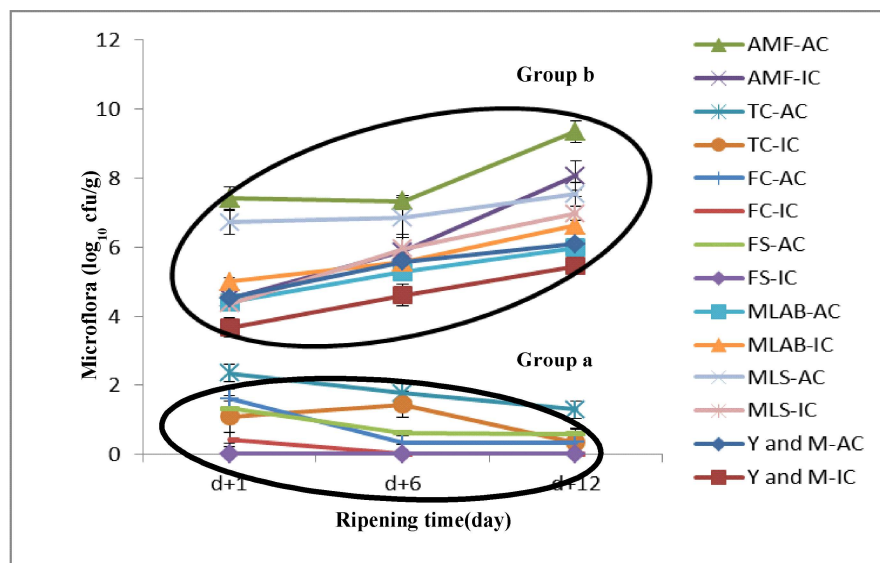
The results of the microflora evolution during ripening show an inverse relationship between two microbial groups (Figure 3). The group a, including faecal streptococci and faecal and total coliforms, decreased gradually during ripening. The group b, which consists of total aerobic mesophilic flora, streptococci, Lactobacillus, yeast and molds, increased during the ripening process. The trends were similar for both studied cheeses. The differences were rather concerned with variations in the number and in the distribution of the microflora. Indeed, the growth of the microflora during ripening of AC recorded significant differences between the first and the twelfth days for AMF (7.41 ± 0.35 log cfu/g and 9.35 ± 0.31 log cfu/g respectively), MLAB (4.41 ± 0.23 log cfu/g and 5.98 ± 0.49 log cfu/g respectively), FC (1.60 ± 0.08 log cfu/g and 0.331 ± 0.41 log cfu/g respectively) and FS (1.33 ± 0.2 log cfu/g and 0.58 ± 0.15 log cfu/g respectively). However, IC recorded a slight contamination of TC from the beginning until the sixth day of ripening then it dropped drastically at the twelfth day. With regard to fecal coliform, it disappeared from the sixth day of ripening stage of IC.

The decrease of contamination and the pathogen microflora, during the ripening process of cheese raw milk, is due to the increase in the ripening microflora, which modifies the physico-chemical parameters (a_w and pH) and releases peptides with antibacterial activity (Fontan et al. 2001; Arenas et al. 2004; Kirdar et al. 2018). However, some studies demonstrated that coliforms decrease during the first week and then increase till the end of the ripening process, with higher rates for the Camembert made

Table 5 Microbiological count in milk

Microflora (log ₁₀ CFU/mL)	Raw milk	Pasteurized milk
Aerobic mesophilic flora (AMF)	$4.99^b \pm 0.306$	$3.71^a \pm 0.42$
Total coliforms (TC)	$1.66^b \pm 0.11$	$0.32^a \pm 0.24$
Faecal coliforms (FC)	$0.19^b \pm 0.17$	$0.0033^a \pm 0.004$
Faecal streptococci (FS)	0	0
Mesophilic lactobacilli (MLAB)	$3.63^b \pm 0.46$	$0.96^a \pm 0.178$
Mesophilic lactic <i>streptococcus</i> (MLS)	$2.49^b \pm 0.22$	$0.4^a \pm 0.14$
Yeast and molds (Y and M)	$1.57^b \pm 0.19$	$0.15^a \pm 0.19$

Results in the same column for the same parameter with different letters are significantly different at $P < 0.05$

Fig. 3 Microflora evolution in the cheeses during ripening

Legend: Artisanal Camembert (AC), Industrial Camembert (IC). **Group a:** Contaminating flora (Total coliforms (TC), Faecal coliforms (FC), Faecal streptococci (FS)). **Group b:** Ripening flora (Aerobic mesophilic flora (AMF), Mesophilic lactobacilli (MLAB), Mesophilic lactic streptococcus (MLS), Yeast and molds (Y and M)).

Table 6 Antibacterial activity statistics for the raw and neutralized supernatants

Strains	Supernatants	Cheeses type	Inhibition zone diameter (mm)
			Mean $\pm$ SD
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Raw	IC	10.8 $\pm$ 0.97
		AC	10.5 $\pm$ 0.98
	Neutralized	IC	10 $\pm$ 1.94
		AC	8.8 $\pm$ 0.32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Raw	IC	11.7 $\pm$ 0.21
		AC	11.3 $\pm$ 0.21
	Neutralized	IC	8.2 $\pm$ 0.64
		AC	7.9 $\pm$ 0.32

from raw milk than for those made from pasteurized milk (Mourgues et al. 1977; Rutzinski et al. 1979).

Antimicrobial activity analysis

The results of the analysis of the supernatant antimicrobial activity are reported in the Table 6. The presence of inhibition zones after neutralization of the supernatants suggests that the antibacterial effect could only be due to the presence of antibacterial substances, such as bacteriocins and bioactive peptides (Ortolani et al. 2010; Corrêa et al. 2011).

Cheese protection against pathogens proliferation can be performed by the indigenous antimicrobial agents of milk, such as lactoferrin (Farnaud and Evans, 2003), lactoperoxidase system (LPS) (Seifu et al. 2005) and lysozyme (Claeys et al. 2013). These agents are inactivated by the heat treatment (Conesa et al. 2010;

Dumitraşcu et al. 2012; Claeys et al. 2013). These results explain in large part the decrease in the contaminating microflora during the ripening of AC and the role of the lactic microflora of the raw milk during the cheese ripening, thanks to their proteolytic activity and the production of bacteriocins.

Most of known varieties of cheeses contain a certain amount of kappacins (A and B) in form of caseinomacropeptide, with an antimicrobial activity, which are released as a result of the action of coagulant enzymes (rennet or other coagulant enzymes) on the κ -casein (Vajih, 2012). In the case of the Camembert, many studies demonstrated the effect of lactic bacteria and their products on the inhibition of *Listeria ssp* during cheese ripening (Wan et al. 1997). Lignitto et al. (2012) and Nguyen Thi et al. (2013) reported that inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by water soluble extracts of cheese made from raw milk is attributed to peptides with MW < 1 kDa and to the

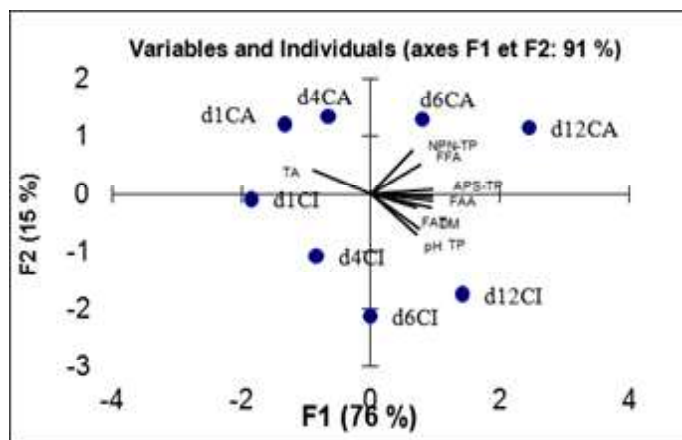


Fig. 4 Factorial plane 1-2 of the component analysis for the physicochemical changes during cheese ripening

antimicrobial peptides α_s1 -CN f(1-23) et α_s2 -CN f(183-207). The antimicrobial activity of the cheese water-soluble extracts could not only be attributed to the known intact bacteriocins with MW > 3 kDa, but also for the fraction with MW > 10 kDa (Drider et al. 2006; Pritchard et al. 2010). During the ripening process of the Camembert, 15 peaks-RPHPLC were identified as potentially bioactive, all stemming from β -CN with predominance of antibacterial fragments β -CN f(193-209) (Galli et al. 2019).

Interactions among the physicochemical and microbiological parameters and their progress during ripening

A PCA was run to analyze the interactions between the physicochemical and microbiological parameters and their evolution during ripening. The results related to physicochemical parameters during cheese ripening are presented in Figure 4.

The first two axes explain 91% of the total variance. Axis F1 represents the maturity (temporal) gradient during the ripening process. F2 represents the type of the product. The projection of the means obtained from the three years of study from the same stage of ripening shows that F1 opposes the artisanal Camembert to the industrial. The small distance between d1AC and d4AC shows the high correlation (low changes) registered between the two first considered ripening stages of AC. In contrast, the temporal gradient revealed great changes (lower correlations) from the second stage of ripening, expressed here by an increase in the distance between successive stages (d4AC, d6AC, and d12AC). At the same stages, these differences were less pronounced during IC ripening, which registered an appreciable change only between the two last stages (J6IC and J12IC). The degree of maturation of AC is the result of the combined effects related to the production conditions and the physicochemical and microbiological proprieties of the raw milk. Consequently, IC is richer in DM, fat and proteins, but less matured than AC. Moreover, the factorial plane 1-2 highlights the concentration of

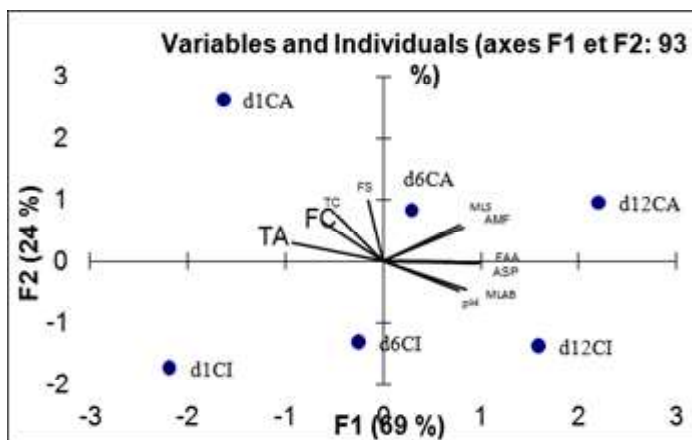


Fig. 5 Factorial plane 1-2 of the component analysis for the physicochemical and microbiological parameters interactions during ripening

the points representing fat, DM and proteins close to the last stage of ripening for IC, while the points representing the maturation index (ASP, NPN, FAA and FFA) are gathered towards this final ripening stage of AC.

The results of the component analysis for the physicochemical and microbiological parameters interactions during ripening are presented in Figure 5.

The axes F1 and F2 expressed 69 % and 24 % of the total variance respectively. The change in the physicochemical parameters is opposed to the contaminating microorganisms. F2 opposes the coliforms (faecal and total), the faecal streptococci to the mesophilic lactic bacteria (*Streptococci* and *Lactobacillus*), the MFAT, molds and yeasts. This axis also opposes contaminating germs to pH, FAA and ASP.

A scan of figures 4 and 5 explains the decrease of pathogenic organisms during ripening of the artisanal cheese. This could be due to the action of indigenous enzymes of the raw milk and increase in of lactic bacteria and the fungal flora, which lead to the release of bioactive peptides, with antibacterial effects by their proteolytic action, and production of bacteriocins by lactic bacteria. These results are confirmed by the correlation matrix obtained between the physicochemical and microbiological parameters, which revealed that molds and yeasts have an impact on the proteolysis, with significant ($P < 0,05$) positive correlations with the proteolysis products of ASP ($r = 0.88$) and FAA ($r = 0.90$). MLAB showed significant negative correlations with the pathogenic organisms TC ($r = -0.87$), FC ($r = -0.84$) and FS ($r = -0.86$). This explains the effect of MLAB on the decrease of these pathogenic germs during ripening of the cheeses made from raw milk and the role of lactic microflora in their bio-conservation.

Conclusions

The physicochemical parameters showed the same trends and recorded higher values in the Camembert made from raw milk. The inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by the neutralized water-soluble fractions revealed the effect of the bioconservation of the camembert made from raw milk by an eventual presence, in the cheese, of bacteriocins and bioactive peptides with antibacterial effect. The current study opens up new perspectives within the framework of the dairy industry in Algeria, encouraging stockbreeders and farmers to transform the raw milk into healthy dairy products and provide steady and more active incomes than those generated from selling milk to collectors.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Said Slimani, who read through the text, for his suggestions regarding the English and we also would like to thank Miss Lamia Bouadjela and Zobiri Assia for their technical assistance, from university Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou (Algeria).

References

- Addeo F, Pelissier JP, Chianes AL (1980) Specific action of milk-clotting enzymes on water buffalo caseins. I. Effect of chymosin on β -casein. *J Dairy Res* 47:421-426. doi:10.1017/S0022029900021324
- AFNOR (Association Française de Normalisation) (1980) Lait. Détermination de la matière sèche. NF V04 207. In : AFNOR (Ed.), Recueil de normes françaises. Laites et produits laitiers. Méthodes d'analyse. Paris : Normalisation française, 33-34
- Aissaoui ZO, Benatallah L, El Hannachi G, Zidoune MN (2011) Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened bouhezza cheese. *J Food Agric Environ* 9: 69-100
- Arenas R, Gonzalez L, Bernardo A, Fresno JM, Tornadijo ME (2004) Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control* 15: 271-279. doi:10.1016/S0956-7135(03)00067-7
- Barac M, Smiljanic M, Žilic S, Pesic M, Stanojevic S, Vasic, M, Vucic T, Kostic A (2016). Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and insoluble protein fractions of white cow cheese at different stage of ripening. *Mljekarstvo* 66: 187-197. doi: 10.15567/mljekarstvo.2016.0303
- Batool M, Nadeem M, Imran M, Imran TT, Jalees AB, Ayaz M (2018) Lipolysis and antioxidant properties of cow and buffalo cheddar cheese in accelerated ripening. *Lipids Health Dis* 17: 1-10. doi:10.1186/s12944-018-0871
- Benfeldt C, Sorensen J, Katrine H, Petersen E, Petersen T (1997) Heat treatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J* 7: 723-731. doi: 10.1016/S0958-6946(97)00083-6
- Benfeldt C, Sorensen J (2001) Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J* 11: 567-574. doi :10.1016/S0958-6946(01)00078-4
- Bertolino M, Dolci P, Giordano M, Rolle L, Zeppa G (2011) Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chem* 129: 1001-1011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.060
- Bouton Y, Guyot P, Dasen A, Grappin R (1993) Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté : I. Validation sur mini fromages des techniques de laboratoire. *Le Lait* 73: 265-279. doi: 10.1051/lait: 1993325
- Bouton Y, Guyot P, Dasen A, Grappin R (1994) Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté : II .Application en sites industriels. *Le Lait* 74: 33-46. doi: 10.1051/lait: 199414
- Buffa M, Trujillo AJ, Roy C, Guamis B (2000) Changes in chemical and microbiological characteristics of goat cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated milk. *High Pressure Res* 19: 27-32. doi :10.1080/08957950008202531
- Claeys WL, Cardoen S, Daube G, De Block J, Dewettinck K, Dierick K, De Zutter L, Huyghebaert A, Imberechts H, Thiange P, Vandenplas Y, Herman L (2013) Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control* 31: 251-262. doi :10.1016/j.foodcont.2012.09.03
- Conesa C, Rota C, Castillo E, Perez MD, Calvo M, Sanchez L (2010) Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three food borne pathogens. *Int J Dairy Technol* 63: 209-215. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00567.x
- Corrêa APF, Daroit DJ, Coelho J, Meira SM, Lopes FC, Segalin J, Risso PH, Brandelli A (2011) Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J Agr Food Chem* 91: 2247-2254. doi:10.1002/jsfa.4446
- Deeth H C, Fitzgerald C H, Wood A F (1975) A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *Aust J Dairy Technol* 30:109-111
- Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol* 70:564-582. doi: 10.1128/MMBR.00016-05
- Dumitrașcu L, Stănciuc N, Stanciu S, Răpeanu G (2012) Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk - A comparative kinetic and thermodynamic study. *J Food Eng* 113: 47-52. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.028
- Dupas C, Adt I, Cottaz A, Boutrou R, Molle D, Jardin J, Jouvet T, Degraeve P (2009) A chromatographic procedure for semi-quantitative evaluation of casein phosphopeptides in cheese. *Dairy Sci Technol* 89: 519-529. doi:10.1051/dst/2009027
- Farnaud S, Evans RW (2003) Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 40: 395-405. doi:10.1016/S0161-5890(03)00152-4
- Fontan MCG, Franco I, Prieto B, Tornadijo ME, Carballo J (2001) Microbiological changes in 'San Simoon' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiol* 18: 25-33. doi:10.1006/fmic.2000.0351
- Franco I, Prieto B, Urdiales R, Fresno JM, Carballo J (2001) Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de Aliva cheese: a Spanish traditional variety. *Food Chem* 74: 463-469. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00164-9
- Galli BD, Baptista DP, Cavalheiro FG, Negrab F, Eberlin MN, Gigante ML (2019) Peptide profile of Camembert-type cheese: Effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Res Int* 234:71-75. doi:10.1016/j.jfoodmicro.2016.06.025
- Gebreyowhans S, Zhang S, Pang X, Yang B, Wang T, Wu Z, Lu J, Iaping J (2020) Changes in texture, composition and sensory characteristics of Camembert cheese made from a mixture of goat milk and cow milk during ripening. *Int J Dairy Technol*. doi: 10.1111/1471-0307.126990
- Gérard Y (2015) Contractualisation et modes de coordination dans la filière laitière. *Économie rurale* 345: 87-100. doi: 10.4000/economierurale.4580

- Gobbetti M, Morea M, Baruzzi F, Corbo M R, Matarante A, Considine T, DiCagno R, Guinee T, Foxd PF (2002) Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *Int Dairy J* 12: 511-523
- Gonzalez J, Mas M, Tabla R, Moriche J, Roa I, Rebollo JE, Cáceres P (2003) Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibore goat's milk cheeses. *Le Lait* 83:193-202. doi : 10.1051/lait:2003009
- Gripon J C, Desmazeaud M J, Lebars D, Bergere J L (1975) Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages : II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait* 55:502-516. doi : 10.1051/lait:197554828
- Guerra-Martínez J A, Montejano J G, Martín-del-Campo S T (2012) Evaluation of proteolytic and physicochemical changes during storage of fresh Panela cheese from Queretaro, Mexico and its impact in texture. *CYTA-J Food* 10: 296-305. doi: 10.1080/19476337.2011.653791.
- JORADP (Journal officiel de République Algérienne Démocratique et Populaire) (2014) Arrêté 17 du 17-12-2013 relatif à la détermination de la matière grasse dans le fromage. JORADP n°67 du 12-11-2014
- JORADP (Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire) (2017) n°39 du 2 juillet 2017. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires, pp 13-15
- Joffin C, Joffin J N (1999) Microbiologie alimentaire. CRDP d'Aquitaine, 5th edn, Bordeaux, pp 213-215
- Kali S, Benidir M, Ait Kaci K, Belkheir B, Benyoucef MT (2011) Situation de la filière lait en Algérie: Approche analytique d'amont en aval. *Livest Res Rural Dev* 23:1-12
- Kirdar SV, Kursun-Yurdakul O, Kalit S, Kalit MT (2018) Microbiological changes throughout ripening of Keş cheese. *J. Cent. Eur. Agric* 19:61-71. doi: /10.5513/JCEA01/19.1.2024
- Laemmli V K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Leclercq-Perlat M N, Oumer A, Buono F, Bergere J L, Spinnler H E, Corrieu G (2000) behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of soft Smear Cheese from reconstituted milk: Protein Degradation. *J Dairy Sci* 83:1674-1683
- Leclercq-Perlat M N, Buono F, Lambert D, Latrille E, Spinnler H E, Corrieu G (2004) Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *J Dairy Res* 71: 346-354. doi: 10.1017/S0022029904000196
- Lenoir J (1963) La flore microbienne du Camembert et son évolution au cours de la maturation. *Le Lait* 43: 262-270. doi: 10.1051/lait:1963425-42611
- Lignitto L, Segato S, Balzan S, Cavatorta V, Oulahal N, Sforza S, Degraeve P, Galaverna, G, Novelli E (2012) Preliminary investigation on the presence of peptides inhibiting the growth of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in Asiago d'Allevio cheese. *Dairy Sci & Technol* 92: 297-308. doi: 10.1007/s13594-012-0057
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Mamine F, Bourbouze, Arbouche F (2011) La production laitière locale dans les politiques de la filière lait en Algérie. Cas de la wilaya de Souk Ahras. *Livest Res Rural Dev* 23: 1-2
- Mane A, McSweeney PLH (2019) Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during Ripening. *J Food Biochem*. doi.org/10.1111/jfbc.13101
- McSweeney PLH, Fox PF, Lucey J, Jordan KN, Cogan TM (1993) Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int Dairy J* 3: 613-634. doi: 10.1016/0958-6946(93)90104-8
- Meribai A, Jenidi R, Hammouche Y, Bensoltane A (2017) Physico-chemical characterization and microbiological quality evaluation of klila, an artisanal hard dried cheese from Algerian's arid areas: Preliminary study. *J New Sci Agric and Biotech* 40: 2169-2174
- Motta A S, Brandelli A (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol* 92:63-70. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01490.x
- Mourgues R, Vassal L, Auclair J, Mocquot G (1977) Origine et développement des bactéries coliformes dans les fromages à pâte molle. *Le Lait* 57: 131-149. doi: 10.1051/lait:1977563-5645
- Nalepa B, Olszewskaa M A, Markiewicz L M (2018) Seasonal variances in bacterial microbiota and volatile organic compounds in raw milk. *Int J Food Microbiol* 267:70-76. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.024
- Nguyen Thi P, Dupas C, Adt I, Degraeve P, Ragon M, Missaoui MF, Novelli E, Segato S, Dong PT, Oulahal N (2013) Partial characterisation of peptides inhibiting *Listeria* growth in two Alpine cheeses. *Dairy Sci Technol* 94: 61-72. DOI: 10.1007/s13594-013-0141-6
- Orlyuk YT, Stepanishchev MI (2014) Assessment of proteolysis and lipolysis intensity in pechersky cheese ripening in the presence of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* molds. *Foods and Raw Mater* 2: 36-39. doi: 10.12737/4128
- Ortolani MBT, Moraes PM, Perin LM, Vicoso GN, Carvalho KG, Silva JA, Nero LA (2010) Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. *J Dairy Sci* 93: 2880-2886. doi: 10.3168/jds.2009-3000
- Polychroniadou A (1988) A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. *J Dairy Res* 55: 585-596. doi: 10.1017/S0022029900033379
- Pritchard S, Phillips M, Kailasapathy K (2010) Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Res Int* 43: 1545-1548. doi: 10.1016/j.foodres.2010.03.007
- Randoin L, Jourdan C (1952) Détermination des teneurs en eau et matière sèche, en calcium et en phosphore de deux variétés de fromages à pâte demi-dure et à moisissures internes. *Le Lait* 32 : 481-485. doi: <https://doi.org/10.1051/lait:195231818>
- Richard J, Zadi, H (1983) Inventaire de la Flore Bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Le Lait* 63: 25-42. doi: [org/10.1051/lait:1983623-6243](https://doi.org/10.1051/lait:1983623-6243)
- Rutzinski JL, Marth EH, Olson NF (1979) Behavior of *Enterobacteriaceae* and *Hafnia* Species during the Manufacture and Ripening of Camembert Cheese. *J Food Prot* 42: 790-793. doi:10.4315/0362-028X-42.10.790
- Saboya LV, Goudédranche H, Maubois JL, Lerayer ALS, Lortal S (2001) Impact of broken cells of lactococci or propionibacteria on the ripening of Saint-Paulin UF-cheeses: extent of proteolysis and GC-MS profiles. *Le Lait* 81: 699-713
- Sahraoui Y, Fayolle K, Leriche F, Le Flèche-Matéos A, Sadoun D (2015) Antibacterial and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* KJ660075 strain selected for its inhibitory power against *Staphylococcus aureus* for cheese quality improving. *J Food Sci Technol* 52: 7133-7142. doi: 10.1007/s13197-015-1845-9
- Samelis J, Lianou A, Kakouri A, Delbes C, Rogelj I, Bojana BM, Montel MC (2009) Changes in the Microbial Composition of Raw Milk Induced by Thermization Treatments Applied Prior to Traditional Greek Hard Cheese Processing. *Journal Food Prot* 72: 783-790.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF (2005) Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications. *Trends Food Sci Technol* 16: 137-154. doi:10.1016/j.tifs.2004.11.002

- Spike PW, Freeman A E (1967) Environmental influences on monthly variation in milk constituents. *J Dairy Sci* 50: 1897-1904
- Suliman EAM, Mohamed Ali RA, Abdel Razig KA (2012) Production and Effect of Storage in the Chemical Composition of Mozzarella Cheese. *Int J Food Sci Nutr Engin* 3: 21-26. doi: 10.5923/j.food.20120203.02
- Trujillo AJ, Guamis B, Carretero C (1997) Hydrolysis of Caprine β -Casein by Plasmin. *J Dairy Sci* 80: 2258-2263. doi:10.3168/jds.S0022-0302 (97)76174-5
- Upreti P, Metzger LE, Hayest KD (2006) Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on cheddar cheese quality: Proteolysis during ripening. *J Dairy Sci* 89:444-453
- Vajihah F (2012) Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. *Ann Biol Res* 3: 2520-2526
- Van Hekken DL, Tunick MH, Tomasula, PM, Francisco J, Corral M, Gardea A (2007) Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. *Int J Dairy Technol* 60: 5-12. doi: 10.1111/j.1471-0307.2007.00291.x
- Visser S (1993) Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavor. *J Dairy Sci*: 329-350. doi:10.3168/jds.s0022-0302 (93)77354-3
- Wan K, Harnmark BE, Davidson AJ, Hillier JB, Gordon A, Wilcock MW, Hickey MJ (1997) Covalent-Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J Appl Microbiol* 82: 273-280