

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Frères Mentouri Constantine

Faculté des Sciences

Département de Nutrition, Alimentation et Technologie Agro-alimentaire

Mémoire

De Magister en Sciences Alimentaires

Option Nutrition Appliquée

Thème

Qualité du fromage à pâte molle type Camembert fabriqué à la laiterie de *Draa Ben Khedda* : nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l'affinage et de l'entreposage réfrigéré du fromage.

Présenté par: OUALI Samia ép. ABDOUNE

Devant le Jury composé de

- **Président:** Mr ZIDOUNE. M. N. Maître de conférences Université des *Frères Mentouri* Constantine.
- **Rapporteur:** Mr MATI. A. Maître de conférences Université *M. Mammeri* Tizi-Ouzou.
- **Examineurs:**
 - Mr AGLI. A. Maître de conférences Université des *Frères Mentouri* Constantine.
 - Mme MATI. F. Maître de conférences Université *M. Mammeri* Tizi-Ouzou.

Année universitaire 2002-2003

REMERCIEMENTS

Mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance vont à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail particulièrement :

**Mr MATI A. pour ses conseils, ses orientations et surtout pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires afin de réaliser ce travail.*

**Mr ZIDOUNE M.N. de m'avoir honoré en présidant mon jury.*

**Mme MATI F. et Mr AGLI A. d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Le personnel du service de la production et du laboratoire de la Laiterie de Draa Ben Khedda pour leur aide dans la réalisation des essais de fromages.

Enfin, que tous ceux et celles qui, de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce mémoire, trouvent ici mon estime, ma sympathie ainsi que mes vifs remerciements.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION GENERALE -----	1
I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Aperçu sur les protéines du lait :-----	3
1.2. Fromage à pâte molle type <i>Camembert</i> :-----	8
1.2.1. Caractéristiques et valeur nutritionnelle :-----	8
1.2.1.1. Définition :-----	8
1.2.1.2. Composition et valeur nutritionnelle :-----	8
1.2.2. Les étapes de la fabrication:-----	10
1.2.2.1. Nature de la matière première :-----	10
1.2.2.2. Traitements préliminaires du lait :-----	10
1.2.2.2.1. Standardisation-----	10
1.2.2.2.2. Homogénéisation :-----	11
1.2.2.2. Traitements thermiques :-----	11
1.2.2.3. Les étapes clés de la fabrication du <i>Camembert</i> :-----	12
1.2.2.3.1. La phase d'ensemencement et de maturation:-----	12
1.2.2.3.2. La coagulation :-----	12
1.2.3.2.3. L'égouttage :-----	13
1.2.3.2.4. L'affinage :-----	14
1.3. Caractéristiques et évaluation de la phase d'affinage :-----	14
1.3.1 Introduction :-----	14
1.3.2. Les facteurs de variation de l'affinage :-----	14
1.3.2.1. L'aération et la composition de l'atmosphère :-----	17
1.3.2.2. L'activité de l'eau :-----	17
1.3.2.3. La température :-----	18
1.3.2.4. Le pH :-----	18
1.3.3. Les modifications biochimiques au cours de l'affinage :-----	18
1.3.3.1. Fermentation du lactose :-----	18
1.3.3.2. Hydrolyse de la matière grasse : Lipolyse-----	20
1.3.3.3. La protéolyse:-----	21
1.3.3.3.1. Mécanisme général de la dégradation des protéines :--	21
1.3.3.3.2. Les enzymes protéolytiques et leur action :-----	21
1.3.3.3.2.1. Protéase alcaline (plasmine) :-----	25
1.3.3.3.2.2. Protéase acide :-----	25
1.3.3.3.2.3. La présure :-----	25
1.3.3.3.2.4. Protéases d'origine microbienne :-----	26
1.3.3.3.2.4.1. La flore psychrotrophe :-----	26
1.3.3.3.2.4.2. La flore lactique :-----	26
1.3.3.3.2.4.3. La flore secondaire :-----	27
1.3.3.3.2.4.4. Les protéases des levures :-----	27
1.3.3.3.2.4.5. Les protéases de la flore fongique microbienn-	27
1.3.3.3.3. Modes d'évaluation de l'activité protéolytique:-----	28
1.3.3.3.3.1. L'extraction de l'échantillon :-----	28
1.3.3.3.3.2. L'analyse quantitative :-----	28
1.3.3.3.3.3. L'analyse qualitative :-----	29
1.3.3.3.3.3.1. Techniques électrophorétiques :-----	29

1.3.3.3.3.2. Méthodes chromatographiques :-----	30
---	----

II. MATERIEL ET METHODES :

2.1. Matériel :	
2.1.1. Appareillage :-----	31
2.1.2. Autre matériel : -----	31
2.1.3. Produits chimiques et réactifs :-----	32
2.2. Méthodes :	
2.2.1. Prélèvements et préparation des échantillons :--- -----	32
2.2.2. Analyses physico-chimiques :--- -----	33
2.2.2.1. Détermination du pH et de l'acidité :-----	33
2.2.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse :-----	33
2.2.2.3. Détermination de la densité :-----	33
2.2.2.4. Détermination de l'extrait sec total (E.S.T) :-----	34
2.2.2.5. Détermination de la teneur en lactose :-----	34
2.2.2.6. Détermination de la teneur en chlorures :-----	34
2.2.2.7. Détermination de la teneur en protéines :-----	34
2.2.2.7.1. Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl:-----	34
2.2.2.7.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry <i>et al</i> :---	35
2.2.3. Effet du traitement thermique :-----	36
2.2.4. Analyse de la microflore intervenant au cours de l'affinage: -----	36
2.2.4.1. Flore mésophile totale :-----	37
2.2.4.2. Flore lactique :-----	37
2.2.4.2.1. Dénombrement des Streptocoques lactiques :-----	37
2.2.4.2.2. Dénombrement des lactobacilles :-----	37
2.2.4.3. Flore halotolérante :-----	37
2.2.4.4. Levures et moisissures : -----	37
2.2.5. Evaluation du degré de la protéolyse :-----	38
2.2.5.1. Evaluation qualitative par suivi du comportement électrophorétique:-----	38
2.2.5.1.1. Préparation des échantillons :-----	38
2.2.5.1.1.1. Echantillons de lait :-----	38
2.2.5.1.1.2. Echantillons de fromage :-----	40
2.2.5.1.2. Contrôle électrophorétique :-----	40
2.2.5.1.2.1. Définition et principe : -----	40
2.2.5.1.2.2. Propriétés générales :-----	40
2.2.5.1.2.3. Conduite de l'électrophorèse :-----	42
2.2.5.1.2.4. PAGE –native :-----	42
2.2.5.1.2.5. PAGE-Urée :-----	43
2.2.5.2. Evaluation quantitative de la protéolyse :-----	43
2.2.5.2.1. Dosage des groupements NH ₂ libres par emploi d'acide 2-4-6- trinitrobenzène–sulfonique -----	43

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Nature de la matière première et effet du traitement de pasteurisation :---	47
3.1.1. Présentation sommaire de l'unité :-----	47
3.1.2. Diagramme de fabrication et ses particularités:-----	47
3.1.3. Nature de la matière première :-----	50
3.1.3.1. Lait cru :-----	50

3.1.3.2. Lait recombinaé :-	50
3.1.4. Analyses physico-chimiques du lait destiné à la fromagerie :-	51
3.1.5. Effet du traitement de pasteurisation sur les protéines du lait :-	54
3.1.5.1. Comportement électrophorétique des protéines sériques:-	54
3.1.5.2. Détermination du pourcentage de dénaturation :-	54
3.2. Résultats de l'évolution et de l'appréciation du <i>Camembert</i> au cours de la phase d'affinage et de l'entreposage réfrigéré :-	60
3.2.1. Analyses physico-chimiques :-	60
3.2.2. Analyse microbiologique:-	62
3.2.3. Evaluation de l'activité protéolytique :-	66
3.2.3.1. Dosage des groupements aminés libres :-	66
3.2.3.2. Comportement électrophorétique des protéines :-	69
3.3. Discussion générale:-	78
3.3.1. Importance des étapes antérieures à l'affinage :-	78
3.3.2. Appréciation de la phase d'affinage :-	81

CONCLUSION GENERALE:------ **88**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Abréviations

- AFNOR** : Association Française de Normalisation
- APS** : (persulfate d'ammonium)
- AGL** : acides gras libres
- a_w** : activité de l'eau
- a-La** : α -Lactalbumine
- BBP** : bleu de bromophénol
- Bis** : N, N'-méthylène-bis-acrylamide
- b-Lg** : β -Lactoglobuline
- BSA** : albumine sérique bovine
- a_{S1}-CN** : caséine α_{S1}
- a_{S2}-CN** : caséine α_{S2}
- b-CN** : caséine β
- CPG** : chromatographie en phase gazeuse
- Da** : Dalton
- D.B.K** : Draa Ben Khedda
- °D** : degré Dornic
- D.O** : densité optique
- E.S.D** : extrait sec dégraissé
- E.S.T** : extrait sec total
- FAO** : Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture
- FIL** : Fédération International de Laiterie
- FLL** : fromage à base de lait local
- FLM** : fromage à base de lait mixte
- G/S** : gras/sec
- RP-HPLC**: chromatographie liquide de haute performance en phase reverse
- INRA** : institut national de la recherche Agronomique
- J_{er}** : entreposage réfrigéré (jours)
- LABAB** : Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
- LL** : lait frais collecté localement
- LM** : lait mixte (mélange de lait frais et de lait recombinaé)
- 2-ME** : 2-mercaptoéthanol

MGLA : matière grasse laitière anhydre

meq : milliéquivalent

mM : millimolaire

PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PM : poids moléculaire

P/V : poids / volume

S.D.S : dodécylsulfate de sodium

TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène diamine

TNBS : acide 2, 4, 6, trinitrobenzène sulfonique

TRIS : Tris – hydroxy – méthyl – amino - méthane

Introduction générale

L'un des premiers problèmes rencontrés par notre industrie laitière est relatif à la variabilité de la matière première utilisée dans les fabrications de produits divers tels les fromages, les yaourts, les crèmes glacées, le beurre...etc. Cette variabilité trouve sa raison d'être dans l'origine multiple du lait (lait d'importation acheté sous forme de poudre et recombinaison à l'usine, lait cru collecté localement...) et partant de ses qualités hygiénique, physico-chimique et nutritionnelle.

A ces fluctuations, qui ne contribuent pas à faciliter le travail des industriels, s'ajoutent en réalité d'autres qui ont un rapport direct avec les traitements technologiques opérés avant ou pendant la transformation du lait en question. Il s'agit notamment de la réfrigération, de l'homogénéisation, de l'agitation mécanique, et enfin des traitements thermiques tels la thermisation et la pasteurisation.

Il est évident que le recours à la standardisation de la matière première et des procédés de transformation concourent à donner au produit final des caractéristiques les plus normatives possibles et les plus reproductibles d'une fabrication à une autre.

Dans cette perspective, l'utilisation de plus en plus fréquente par nos Laiteries du mélange (lait cru / lait recombinaison) revêt un caractère important sur le double plan économique et technologique.

Sur le plan économique, la facture du lait importé se chiffre à environ 600 millions de Dollars juste derrière celle des céréales. La production nationale a atteint 1,2 milliard de litres représentant le tiers des besoins (évalués à 3 milliards de litres). Nous comprenons aisément par ces chiffres que l'incorporation progressive du lait cru au lieu et place du lait recombinaison est de nature à réduire la dépendance alimentaire en ce produit de base.

Sur le plan technologique, le mélange (lait cru / lait recombinaison) constitue en lui-même une nouvelle matière première nécessitant par voie de conséquence qu'une étude préalable soit menée pour évaluer ses aptitudes à la transformation en produits dérivés.

A ce titre, les travaux antérieurs menés au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université M. Mammeri de TIZI-OUZOU ont permis de conclure que ce lait mixte (mélange de lait frais collecté localement et du lait recombinaison), utilisé à certaines proportions, est avantageux sur les doubles plans nutritionnels et technologiques dans la fabrication du fromage à pâte molle type *Camembert*.

En continuité de ces investigations sur ce type de produit et, afin de mieux cerner le rôle de la phase d'affinage dans la maturation de ce fromage et l'acquisition de ses

caractéristiques organoleptiques recherchées, nous nous sommes proposés d'évaluer l'activité protéolytique, prépondérante dans cette étape, par le dosage des groupements aminés libérés en utilisant un réactif spécifique (le TNBS) et par le suivi du comportement électrophorétique des caséines.

L'impact du traitement de pasteurisation appliquée à la Laiterie de Draa Ben Khedda (où ce type de fromage est fabriqué), le développement de la microflore en surface et en profondeur du *Camembert*, l'effet de la durée d'affinage et de l'entreposage du fromage dans une enceinte réfrigérée ont été aussi examinés.

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE :

1.1. Aperçu sur les protéines du lait:

Le lait est un aliment de premier choix dans l'alimentation quotidienne de l'homme vu sa teneur équilibrée en nutriments de base (protides, lipides et glucides), sa richesse en calcium et son apport non négligeable en vitamines (A, B₂, B₅ et B₁₂) et en divers sels minéraux (Tableau I).

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

Dans cet ensemble de constituants, les protéines, dont la teneur moyenne est estimée à 34 g/l, sont primordiales parce que, d'une part, elles confèrent une bonne valeur nutritionnelle au produit (couverture des besoins azotés de l'organisme avec un bon rapport qualité/prix) et, d'autre part, elles permettent de conférer une valeur ajoutée au lait grâce à leurs aptitudes technologiques et leurs propriétés fonctionnelles reconnues (CAYOT et LORIENT, 1998).

Ces protéines peuvent être classées en deux catégories, selon leur solubilité à pH 4,6 (Figure 1) :

1/ les caséines qui constituent 24-28 g/l (soit 80% des protéines totales du lait) sont insolubles à pH 4,6 (qui correspond précisément à leur pHi). Elles comprennent quatre entités majeures dénommées : caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ . Ces protéines ont une finalité alimentaire car elles constituent la base de la transformation du lait en fromage ;

2/ les protéines du lactosérum, qui représentent 5-7 g/l (soit 20 % des protéines totales), sont quant à elles solubles à pH 4,6. Elles regroupent différentes entités ayant une bonne valeur nutritionnelle et douées d'activité biologique variées dont nous distinguons 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 (la Lactoferrine, la Lactoperoxydase, ...) sont aussi présentes mais à des proportions plus réduites.

Les caséines (Tableau II), présentent un certain nombre de caractères communs, dont notamment :

- ce sont des phosphoprotéines peu ordonnées (faible proportion d'hélice α), de type pelotes statistiques où il y'a par une répartition non uniforme des régions polaires et apolaires (CHEFTEL *et al*, 1985) ;

- leur nombre total d'acides aminés et donc le poids moléculaire (PM) est très voisin mais manifestent une forte tendance à l'association ;

- elles se caractérisent par un polymorphisme génétique élevé et sont relativement peu sensibles à l'action de la chaleur.

Ces protéines se différencient en outre par leur charge, leur sensibilité au calcium et à l'action des enzymes protéolytiques.

Dans le lait cru, les caséines sont maintenues en solution grâce à la formation de micelles dont le modèle le plus probable est celui proposé par SCHMIDT (1982) (Figure 2). Ces ensembles moléculaires sont constitués par une dizaine de submicelles formées chacune par l'association des quatre caséines et consolidés par un pontage réalisé par le phosphate de calcium et de magnésium colloïdal.

Il est intéressant de relever dans ce modèle que la caséine κ (avec sa partie polaire) se retrouve au niveau des submicelles superficielles. Cette disposition particulière lui permet d'avoir un effet protecteur sur la stabilité de la micelle en lui conférant une plus grande densité de charges négatives, ce qui est à l'origine de l'effet de répulsion entre les micelles (d'où leur maintien en suspension) car ces dernières portent des charges de même signe.

La déstabilisation des micelles de caséines a pour conséquence la floculation et la précipitation de ces dernières sous forme d'un caillé ou coagulum. Ce dernier va subir une maturation par le biais de l'affinage pour obtenir le produit fini dénommé fromage.

Dans cette technologie, la déstabilisation est souvent menée par l'action combinée de l'acidification engendrée par le développement des bactéries lactiques ajoutées au lait sous forme de levain et par l'action d'une préparation enzymatique commerciale : la présure dont le constituant principal à savoir la chymosine rompt spécifiquement la caséine κ au niveau de la liaison PHE (105)- MET(106) (ECK, 1990).

Tableau I : Composition du lait de vache d'après ALAIS et LINDEN (1994).

	Composition (grammes par litres)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solv.) + eau liée (3,7%)
Glucides : Lactose	49	solution
Lipides	35	
Matière grasse proprement dite	34	Emulsion des globules gras (3 à 5 microns de diam.)
partie insaponifiable, stérols...	0,5	
carotènes, tocophérols	0,5	
Protides	34	
Caséines	27	Suspension micellaire de Phosphocaséinate de calcium solution (colloïdale)
Protéines 'solubles' (globulines, albumines)	5,5	solution (vraie)
Substances azotées non protéiques	1,5	solution ou état colloïdal
Sels :	9	
- de l'acide citrique	2	
- de l'acide phosphorique	2,6	
- de l'acide chlorhydrique (HCl)	1,7	
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	traces	
Extrait sec (total)	127	
Extrait sec non gras	92	

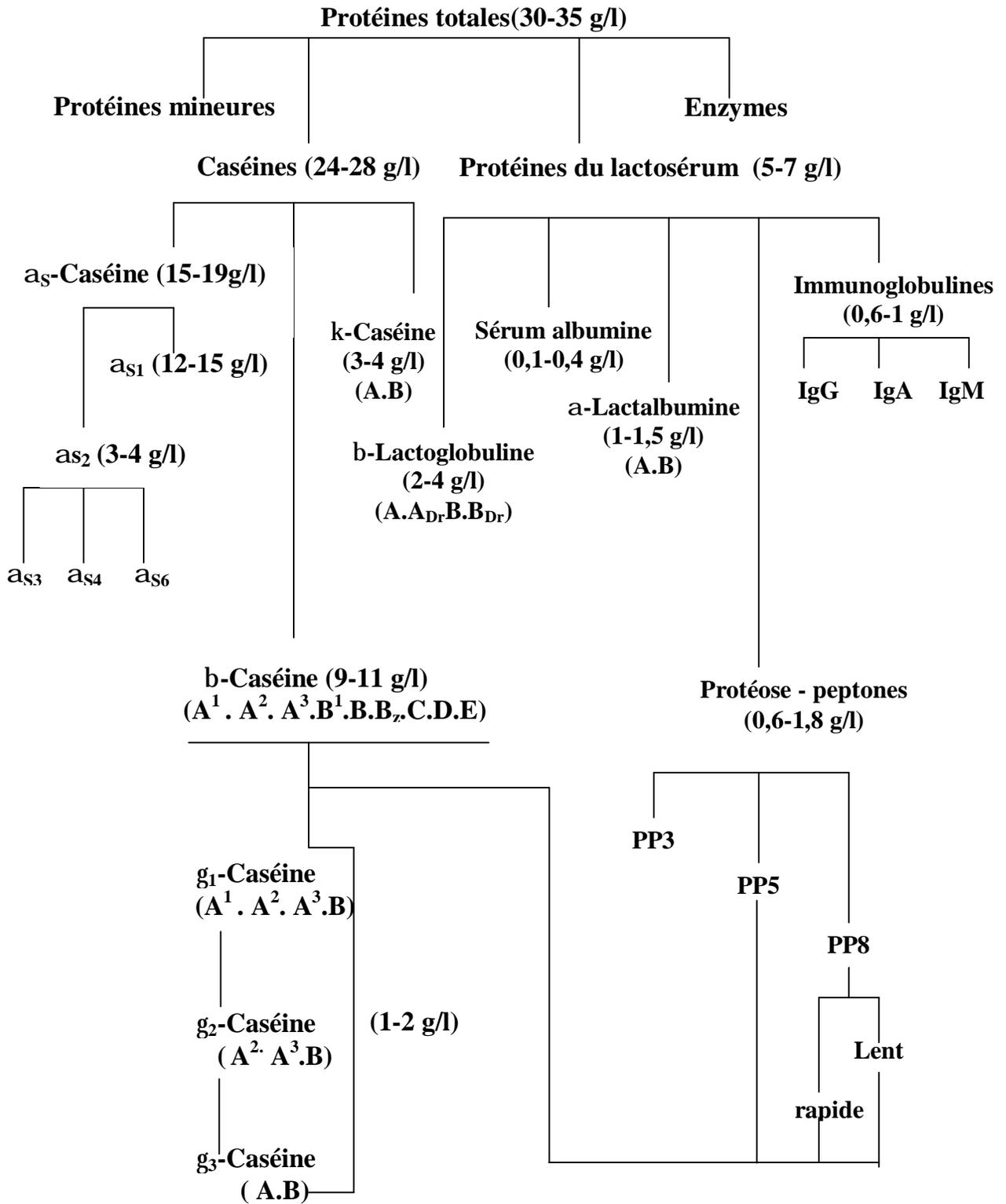


Figure 1 : Composition de la fraction protéique du lait de vache, d'après SWAÏSGOOD (1982).

Tableau II : Principales caractéristiques physico-chimiques des caséines d'après ECK (1990).

	α_{s1}	α_{s2}	b	K
Résidu d'acides aminés	199	207	209	169
Poids moléculaire en Daltons	23600	25200	24000	19000
Résidus cystéine	-	2	-	2
Groupements phosphoséryls	8 – 9	10 – 13	5	1 – 2
Glucides	-	-	-	+
Hydrophobicité (kj / résidu)	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	++	+++	+	-

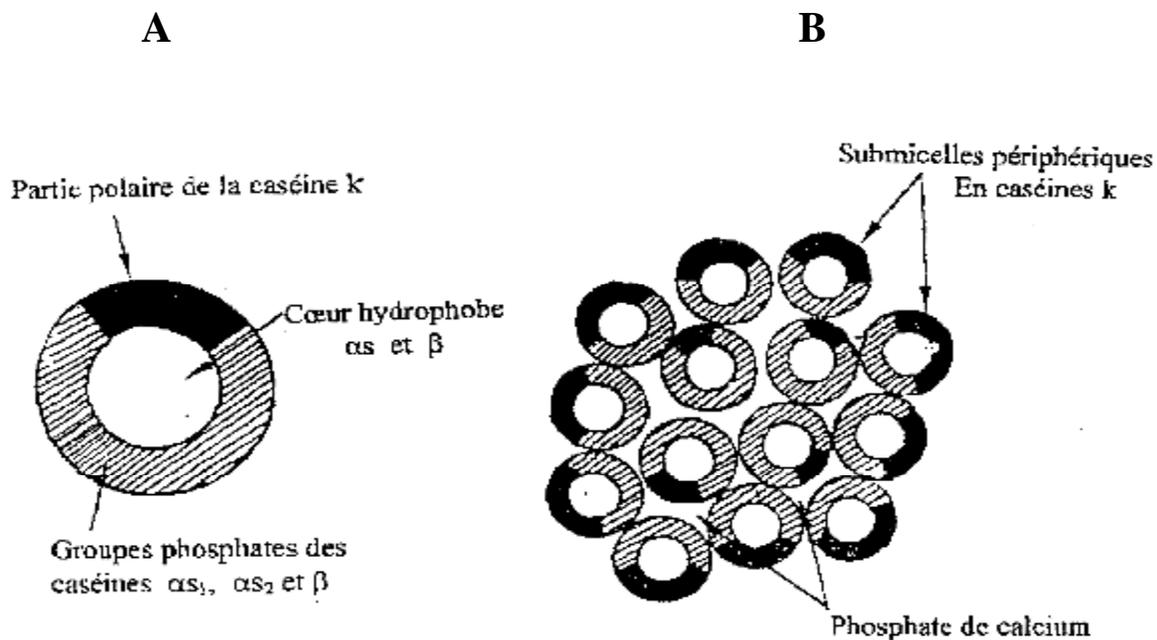


Figure 2 : Représentation d'une submicelle (A) et d'une micelle (B), selon SCHMIDT (1982).

1.2. Le fromage à pâte molle type *Camembert* :

1.2.1. Caractéristiques et valeur nutritionnelle :

1.2.1.1. Définition :

Selon VEISSEYRE (1975), le *Camembert* est défini comme étant un fromage à pâte molle, à caillé non divisé en forme de cylindre plat. Il a un diamètre de 10 à 11 cm et une épaisseur de 3 cm. Il renferme au moins 40 % de matière grasse et 110 g de matière sèche.

C'est un fromage affiné à moisissures superficielles, originaire de Normandie (France).

1.2.1.2. Composition et valeur nutritionnelle :

Le tableau III, donne une composition comparative du lait et du fromage.

Selon son mode d'élaboration, le *Camembert* renferme 30 à 50 % de matière azotée / matière sèche. Il s'inscrit ainsi parmi les meilleures sources alimentaires de protéines ayant une digestibilité élevée (MIETTON, 1995).

De plus, la haute valeur biologique de ces protéines lui est conférée tant par leur composition équilibrée en acides aminés, que par leur propriété de former une pâte fromagère très appréciée par les consommateurs dans de nombreuses régions du monde.

La matière grasse du *Camembert* (25 à 40%) conditionne l'onctuosité de la pâte et constitue une source importante de la flaveur particulière conférée au produit fini (NEELAKANTEN *et al*, 1971).

Concernant le lactose, il faut noter que les fromages affinés sont pratiquement dépourvus de glucides car la faible quantité de lactose, restant dans le caillé après égouttage, est transformée en acide lactique au cours de l'affinage.

Pour les autres nutriments, le *Camembert* constitue un apport important en calcium. (200 à 700 mg/ 100g), en phosphore, en sodium et en vitamines (notamment du groupe B), (ECK, 1990).

Notons enfin que la dénomination petit *Camembert* est réservée à un fromage de diamètre réduit (80-85 mm de diamètre) dont l'extrait sec ne doit pas être inférieur à 60g et que la dénomination *Véritable Camembert* de Normandie est protégée par un label de qualité définissant notamment une aire de production.

**Tableau III : Composition moyenne comparée du lait et des fromages
Selon ALAIS et LINDEN (1993).**

	LAIT	FROMAGES
EAU	Environ 87%	- Éliminée en partie par la fabrication. Teneur en eau varie de : 35 % (pâte cuite dure), 50 % (pâte molle), 80 % (Fromage frais)
GLUCIDES	- Lactose 5 % Les ferments lactiques transforment le lactose en acide lactique, ce sucre peut être également transformé en alcool.	- Pratiquement éliminé avec l'eau par la fabrication.
LIPIDES	- Environ 4 % * Sous forme de globules gras très petit en émulsion dans le liquide ; • Ce sont en majeure partie des triacylglycérols (beaucoup d'oléine) avec un peu de lécithines.	- Se retrouvent dans la majorité des fromages sauf dans les fromages « maigres » : 23 % fromages à pâte molle, 30 % fromages à pâte dure.
PROTEINES	- Environ 3,5 %. Les plus importantes en quantités sont les caséines : 3 % Les protéines du sérum sont aussi d'un apport non négligeable.	- La caséine coagulant avec la présure, est l'élément essentiel de tout les fromages (même maigre) : 18 % fromages à pâte molle, 19 % fromages blancs au lait écrémé, 24 % fromages à pâte ferme.
MINÉRAUX	- Très intéressante valeur minérale car très riche en calcium et en phosphore. Le calcium étant plus abondant que le phosphore, le rapport Ca / p= 1,39 donc le lait est recalcifant. - Contient aussi potassium et chlorure de sodium : - Pas de fer.	- Grande richesse en calcium et en phosphore, surtout dans les fromages à pâte ferme rapport Ca / p= 1,26 en moyenne, donc aliment recalcifant ; - Plus au moins riches en chlorures de sodium selon leur fabrication (adjonction de sel, pâte lavée à l'eau salée, etc...)
VITAMINES	- B ₁ en petite quantité - B ₂ assez importante. - C en quantité variable dans le lait frais, mais pratiquement détruite au contact de l'air durant les manipulations et le transport et par la pasteurisation et l'ébullition. - A en quantité importante dans la matière grasse, donc absente dans les laits écrémés. - D en quantité variable selon la saison.	- Les fromages fermentés à pâte molle, notamment les fromages bleus, sont de bonnes sources de vitamines B, du fait des synthèses réalisées par les moisissures. - Se retrouve dans le fromage selon la teneur en matières grasses

1.2.2. Les étapes de la fabrication :

1.2.2.1 Nature de la matière première :

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

REMEUF *et al* (1991) soulignent en outre que l'aptitude à la transformation du lait en fromage est dépendante d'un certain nombre de paramètres dont :

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

1.2.2.2. Traitements préliminaires du lait :

Aussitôt leur réception à l'usine, les laits sont triés en éliminant ceux impropres à la transformation fromagère (laits plus ou moins acides ayant une charge microbienne importante). Après un entreposage à basse température (3-4°C), ils vont subir certains traitements technologiques (dont notamment l'homogénéisation et le traitement thermique) qui ont pour objectifs de permettre l'obtention d'un produit dérivé de qualité appréciable et ce avec un bon rendement de fabrication (LENOIR, 1974 ; MIRANDA et GRIPON, 1986).

Néanmoins, il a été établi que ces traitements, quand ils sont pratiqués de façon anarchique engendrent plutôt des modifications physico-chimiques et nutritionnelles préjudiciables (FEUILLAT *et al*, 1976 ; LEMIEUX *et al*, 1994) dont nous relèverons plus loin certains de leurs particularismes.

1.2.2.2.1. La standardisation :

Elle consiste à donner au lait la composition correspondante à celle du fromage à élaborer. Elle est réalisée par un ajustement de la teneur en matière grasse (qui doit se situer autour de 28 g/l de lait) et parfois du taux de protéines (qui doit être supérieur à 31 g/kg de fromage) (BERTRAND, 1988).

1.2.2.2. l'homogénéisation :

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

1.2.2.3. les traitements thermiques:

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

Ainsi, la thermisation (traitement qui a lieu à 64°C pendant 15 à 20 secondes) est surtout utilisée pour détruire les bactéries psychrotrophes, qui se développent dans un lait ayant subi, soit une réfrigération à la ferme, soit un stockage réfrigéré au niveau de la fromagerie. Ces bactéries surtout les espèces des genres : *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Flavobacterium* produisent des lipases et des protéases exocellulaires résistantes à la pasteurisation (72-74°C, 15-20 sec) et même à la stérilisation UHT (132°C, 1-2 sec) (LENOIR *et al*, 1983). Ces enzymes peuvent être responsables de goûts désagréables (malté, amer, rance), et de pertes de rendements fromagers.

Comme ce traitement ne peut présenter une protection sûre pour la santé du consommateur, car il ne détruit que partiellement les germes dangereux (BERTRAND, 1988), il est souvent fait recours dans les industries fromagères à la pasteurisation qui présente l'avantage de détruire la totalité des germes pathogènes susceptibles de se trouver dans le lait et de réduire sa flore banale.

Pour cela, des barèmes appropriés (température / temps de chauffage) ont été proposés :

- Pasteurisation basse —————> 63 °C pendant 30 minutes ;
- Pasteurisation haute (HTST) —————> 72°C pendant 20 secondes (LUQUET et BOURDIER, 1991).

1.2.2.3. Les étapes clés de la fabrication du *Camembert* :

L'élaboration de ce type de fromage à caractéristiques organoleptiques particulières passe par la réussite de nombreuses étapes technologiques dont principalement : l'ensemencement – maturation, la coagulation, l'égouttage et enfin l'affinage.

1.2.2.3.1. La phase d'ensemencement – maturation :

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

Le lait (un petit volume) estensemencé par des ferments lactiques mésophiles à une dose de 1,5 à 2% (LENOIR *et al*, 1983). Un temps de maturation suffisant est laissé dans le but de permettre la multiplication et le développement des souches de bactéries lactiques inoculées (BERTRAND, 1988). Une fois ses souches revivifiées, le levain (tel que préparé) servira à ensemencer les grandes cuves de coagulation.

On introduit également des levains fongiques qui jouent un rôle important dans le phénomène de l'affinage. Il s'agit de spores de *Penicillium Camemberti*, *Penicillium caseicolum* ainsi que *Geotrichum candidum*.

1.2.2.3.2. La coagulation :

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

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

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

La coagulation enzymatique est quant à elle due à l'action de la présure qui est une enzyme protéolytique provenant de caillottes de veaux non sevrés. Cette enzyme correspond en réalité à deux fractions actives : l'une majeure (80 %), constituée par la chymosine, l'autre mineure (20 %), est représentée par la pepsine (ECK, 1990).

Il a été établi qu'au cours de la coagulation enzymatique, la présure en hydrolysant la caséine κ au niveau de la liaison (Phe₁₀₅- Met₁₀₆), induit une déstabilisation des micelles de caséines qui vont peu à peu flocculer pour former un gel ferme, compact et ayant une bonne cohésion (VEISSEYRE, 1975).

Tableau IV : Caractéristiques des deux modes habituels de coagulation du lait selon DESMAZEAUD (1992).

	Coagulation par	
	Action des enzymes	Acidification
Processus biochimique	- action enzymatique (lactose non dégradé)	- fermentation lactique
Fermentation de la caséine	- transformation en Paracaséine, séparation d'une partie non protéique	- pas de modification chimique de la protéine elle-même
pH	6,8	vers 4,6
Composition du coagulum	Phospho- paracaséinate de calcium	Caséine (déméralisée)
Nature du coagulum	gel élastique imperméable	gel friable sans cohésion
Synérèse (réaction naturelle du gel et expulsion du sérum)	rapide	lente

1.2.2.3.3. l'égouttage :

C'est l'étape qui permet la séparation du lactosérum du caillé. Son but est non seulement de régler la teneur en eau du caillé mais aussi la minéralisation de ce dernier et son délactosage.

Selon BERTRAND (1988), il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires :

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

La pâte obtenue est salée par addition de chlorure de sodium. Le sel inhibe certaines proliférations microbiennes, complète l'égouttage du caillé et relève la saveur du fromage (ALAIS et LINDEN, 1993).

1.2.2.3.4. L'affinage :

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

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

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

Comme cette étape constitue, pour une grande part, l'objet de notre étude, nous nous proposons d'examiner dans ce qui suit ses différentes réactions, particulièrement l'activité protéolytique.

1.3. Caractéristiques et évaluation de la phase d'affinage :

1.3.1. Introduction :

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

Ce sont ces modifications souhaitées qui sont responsables de la maturation du coagulum et de l'obtention d'un produit dérivé ayant des caractéristiques organoleptiques recherchées.

1.3.2. Les facteurs de variation de l'affinage :

Les facteurs susceptibles d'agir sur le développement des micro-organismes, la production des enzymes et l'activité enzymatique peuvent influencer de façon déterminante sur le processus de maturation de la pâte fromagère. Parmi ces facteurs, il y'a lieu de citer notamment les effets de l'aération et de la composition de l'atmosphère, de l'activité de l'eau, de la température et enfin du pH (ECK, 1990).

**Tableau V : Les grandes transformations biochimiques au cours de l'affinage
selon BERTRAND (1988).**

SUBSTRATS	TYPES DE TRANSFORMATIONS OU MICROORGANISMES IMPLIQUES	PRINCIPAUX PRODUITS FORMES
<ul style="list-style-type: none"> - Protéines - Peptides - Acides aminés - Amines - Cétoacides - Aldéhydes 	<ul style="list-style-type: none"> - Protéolyse - Désamination - Décarboxylation - Dégradation des chaînes latérales - Désamination oxydative - Réduction - Réduction - Oxydation 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptides ; acides aminés -NH₃ ; acides α- cétoniques - CO₂ ; amines - Phénol, indole, méthanéthiol et autres composés soufrés volatils. - NH₃ ; aldéhydes - Aldéhydes - Alcools - Acides
<ul style="list-style-type: none"> - Lactose* - Acide citrique* - Diacétyl - Acide lactique 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentation lactique (Bactéries lactiques homofermentaires) - (Bactéries lactiques hétérofermentaires) - Fermentation alcoolique (levures) - (Bactéries lactiques) - Fermentation propionique ; (Bactéries propioniques) 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide lactique - Acide lactique ; éthanol ; acide acétique ; CO₂ - CO₂, éthanol - CO₂ ; acétaldéhyde ; acétone, diacétyl. - Acétone, butanediol - Acide propionique ; acide acétique ; CO₂
<ul style="list-style-type: none"> - Triglycérides* (glycérides partiels) - Acides gras (à chaîne moyenne ou courte) - Méthylcétones - Acides gras (à chaîne courte) . Ethanol, alcools aliphatiques, ou aromatiques, - Thiols 	<ul style="list-style-type: none"> - Lipolyse - β - oxydation (Penicillium) - Réduction - Estérification 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide gras ; glycérides partiels ; glycérol ; - Méthylcétones (C_{2n-1}) ; CO₂ - Alcools secondaires(C_{2n-1}) - Esters - Thioesters

- Constituants originels (lait)

Tableau VI : Principaux groupes microbiens intervenant au cours de l'affinage du *Camembert* d'après LENOIR *et al* (1983)

Groupes microbiens	Origines	Fonctions
Bactéries STREPTOCOQUES LACTIQUES <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus lactis Sbsp</i> <i>Diacetylactis</i> LEUCONOSTOC LACTOBACILLES <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> MICROCOQUES BACTERIES CORYNEFORMES <i>Corynebacterium</i> <i>Brevibacterium</i>	Levain lactique Lait, éventuellement levain Lait Lait, saumure, sel Lait éventuellement levain	Acidification Production de composants d'arôme Production de composants d'arôme Protéolyse, dégradation des acides aminés Protéolyse, dégradation des acides aminés
Levures <i>Kluyveromyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Saccharomyces</i>	Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, éventuellement levain	Production de composants d'arôme
Moisissures <i>Penicillium Camemberti</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Levain fongique Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, Levain éventuellement	Désacidification Protéolyse, lipolyse production des composants d'arôme Protéolyse, lipolyse, Production de composants d'arôme

1.3.2.1. L'aération et la composition de l'atmosphère

Les besoins en oxygène des micro-organismes sont variables. Certains (comme les bactéries propioniques) sont anaérobies stricts. Ces germes se développent seulement à l'intérieur de la pâte. D'autres sont micro-aérophiles dans le sens où ils se cultivent mieux dans un milieu à teneur limitée en oxygène. C'est le cas notamment des bactéries lactiques, particulièrement les lactobacilles. D'autres enfin, sont strictement aérobies. Ils ne peuvent se développer qu' en surface des fromages (cas des moisissures, levures, microcoques et bactéries corynéformes). Les fromages affinés sous l'action de ces derniers sont, selon CHOISY *et al* (1984), de petit format.

La composition de l'atmosphère peut également intervenir sur le phénomène d'affinage. Ainsi, l'ammoniac présent dans les caves d'affinage des pâtes molles participe à la neutralisation de la partie superficielle du fromage. Il contribue par-là à favoriser le développement et l'action de la flore bactérienne de surface (RIBADEAU-DUMAS ; VASSAL et GRIPON, 1984).

1.3.2.2. L'activité de l'eau :

L'activité de l'eau (a_w) est un facteur important dans le développement microbien et dans l'expression de l'activité enzymatique, car un abaissement à un taux inférieur à 0,5 ralentit cette activité et ne permet pas la multiplication des micro-organismes (il y'a augmentation de la phase de latence et diminution sélective de la vitesse de croissance), ACKER (1996). Par contre, SCHLESSNER *et al* (1992) constatent que cet abaissement de l' a_w contribue à l'augmentation de la fermeté du fromage.

L'effet de la teneur sélective du sel (qui est un des facteurs régulateur de l' a_w) sur le développement des moisissures en surface des pâtes molles est bien connu. Un salage assez prononcé limite ou même empêche la croissance de *Geotrichum candidum* sans affecter notablement celle de *Penicillium* (GUEGUEN *et al*, 1974).

Le salage diminue aussi l'activité des enzymes (lipases et protéases notamment) dans le fromage type *Camembert*. Il a été montré, par KIKUSHI et TAKAFUJI (1971), qu'un taux de sel de 4% en poids entraîne une diminution sensible du degré de protéolyse de 40% après vingt jours d'affinage.

1.3.2.3. La température

C'est un facteur régulateur important de la croissance microbienne et de l'activité enzymatique. Néanmoins, chaque type de réaction particulière nécessite une gamme de température optimale. En effet, les moisissures se développent favorablement à 20-25°C, les bactéries lactiques mésophiles à 30-35°C. L'optimum d'activité pour les lipases se situe entre 30 et 35°C alors qu'il est plus élevé dans le cas des protéases (40-45°C), (MIETTON, 1994). Aux basses températures, cette activité peut être encore appréciable, notamment dans le cas des lipases. Ainsi, il a été montré que la lipase de *Penicillium Camemberti* conserve 50% de son activité maximale à 1°C (LAMBERET et LENOIR, 1976).

1.3.2.4. Le pH :

L'influence du pH sur le développement microbien et l'activité enzymatique est particulièrement déterminante. Parmi les micro-organismes, seules les bactéries lactiques, les levures et les moisissures peuvent se développer à pH inférieurs à 5. L'activité des enzymes est aussi très sensible aux variations de pH. Il a été observé que l'activité maximale de la plupart des protéases microbiennes, se situe dans l'intervalle de pH 5-7,5 et celle des lipases dans la zone 7,5-9,0. Au dessous de pH 4,5, la stabilité de nombreuses enzymes est par contre fortement réduite (MIETTON, 1995).

Dans le *Camembert*, le caillé en fin d'égouttage a un pH voisin de 4,5. Un tel pH ne permet ni le développement des microcoques et des corynebactéries (agents de maturation), ni une action suffisante des protéases. En outre, il limite les interactions protéines-minéraux et protéines-eau qui contribuent à conférer à la pâte fromagère une texture souple et homogène. C'est pour cette raison qu'une certaine neutralisation du caillé est donc nécessaire. Celle-ci est assurée par le développement des moisissures qui utilisent le lactate comme source de carbone.

1.3.3. Les modifications biochimiques au cours de l'affinage :

1.3.3.1. Fermentation du lactose :

Le lactose peut être métabolisé par de nombreux micro-organismes présents dans le lait et les pâtes fromagères. Ce diholoside est clivé par la β galactosidase en glucose et galactose. Ces deux sucres sont ensuite dégradés selon la voie principale des hexoses phosphates (voie de Embden-Meyerhof) et secondairement selon la voie des pentoses phosphates (Figure 3).

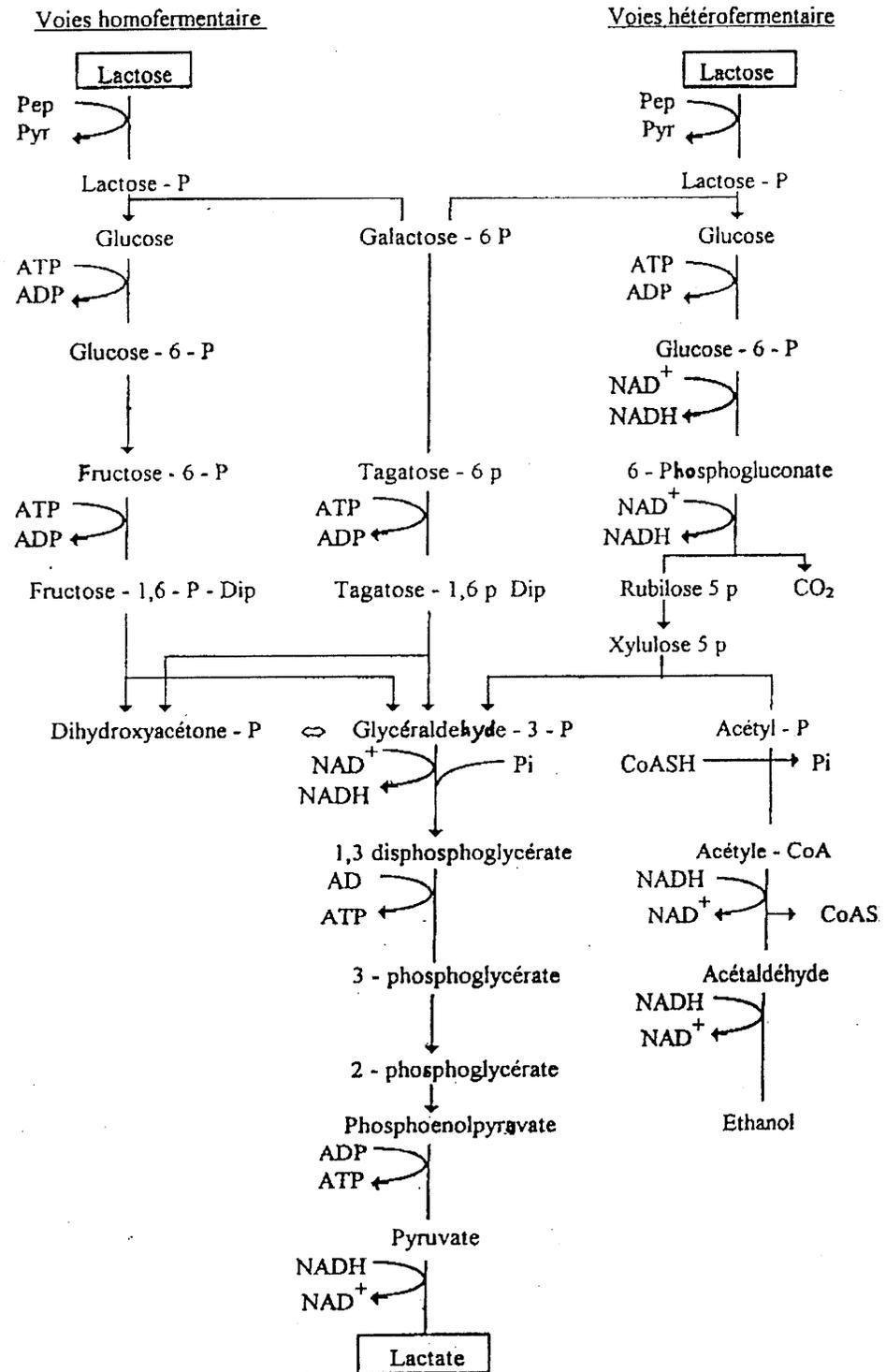


Figure 3 : Catabolisme du lactose chez les streptocoques lactiques et les leuconostoc (COGAN, 1980).

Selon (ECK, 1990), le lactose est métabolisé très tôt dans la pâte du *Camembert*. Les moisissures dégradent rapidement les lactates et leur évolution est particulièrement importante entre le quatrième et le septième jour

Il est à noter que la dégradation des lactates provoque la neutralisation de la pâte et joue un rôle important dans la métabiose du fromage.

Il a été montré par THOMPSON *et al* (1978), que dans un milieu carencé en sucre comme les pâtes fromagères, le métabolisme énergétique des bactéries lactiques peut être perturbé et donner naissance à des quantités importantes de divers composés carbonés tels que l'acide formique, l'acide acétique et l'éthanol. Ces derniers participent néanmoins à la formation de l'arôme et de la flaveur.

MIETTON, (1995) signale aussi que quand la teneur en lactose est trop élevée au démoulage et/ou dans le cas où elle n'est pas rapidement réduite, les bactéries lactiques, même après salage continuent leur métabolisme en provoquant une post-acidification génératrice des défauts de "cœur blanc", de "coulage sous croûte" et d'amertume.

1.3.3.2. Hydrolyse de la matière grasse : La lipolyse :

La matière grasse du lait, participe dans la phase d'affinage à la formation des caractéristiques organoleptiques particulièrement reconnues pour le cas du *Camembert*.

La dégradation de cette matière grasse ou lipolyse peut être due à l'action de la lipase naturelle du lait (notamment dans les fromages au lait cru) et à celle des lipases d'origines microbiennes. Ces agents permettent de transformer les triglycérides en glycérides partiels et acides gras.

CHOISY *et al* (1984) mentionnent que tous les micro-organismes sont susceptibles de produire des lipases mais en quantités plus ou moins importantes selon les espèces ou les souches.

Les micro-organismes des fromages les plus lipolytiques sont les moisissures. En effet, *Penicillium Camemberti* produit une lipase alcaline exocellulaire (DESNOUVEAUX *et al*, 1986).

Selon MOLIMARD *et al* (1997), cette lipase constitue l'agent principal de la lipolyse du *Camembert* qui est plus intense dans la partie superficielle (où elle peut atteindre 30 %) qu'au centre du fromage (KUDZAL-SAVOIE, 1982).

1.3.3.3. La protéolyse

C'est le phénomène le plus important de la phase d'affinage car il affecte à la fois la texture et la saveur. LENOIR *et al* (1983), font observer qu'en partant du caillé égoutté qui contient 4–8 % de substances azotées solubles dans l'eau, on arrive en fin de maturation, dans les hâloirs, à un fromage présentant 20 à 50 % de substances azotées.

Il s'agit d'une digestion progressive comparable à celle qui se produit dans le tube digestif des animaux, mais qui reste limitée. Globalement, cette protéolyse a deux conséquences :

- la pâte fromagère devient plus molle et plus onctueuse ;
- il y'a production de métabolites qui confèrent un arôme et une saveur particulière au fromage (ECK,1990).

1.3.3.3.1. Mécanisme général de la dégradation :

Au cours de la maturation du *Camembert* dans les hâloirs, il y'a hydrolyse enzymatique progressive des caséines en peptides (de tailles variables) et en acides aminés libres.

Les travaux réalisés sur le suivi de cette étape de protéolyse ont montré que les caséines sont d'abord clivées (aux premiers jours d'affinage) aux niveaux des sites préférentiels d'attaques (figures 4, 5, 6 et 7), relativement réduits par protéine. Les autres coupures hydrolytiques interviennent avec le prolongement de la phase d'affinage.

Il a été aussi relevé que les produits de dégradation (notamment les acides aminés libres) sont repris par d'autres réactions pour la synthèse de divers métabolites (figures 8) dont certains participent à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques particulières du *Camembert* (ADDA et DUMONT, 1974 ; DUMONT *et al*, 1976 ; TRIEU-CUOT *et al*, 1982 ; PELISSIER, 1984 ; MIRANDA et GRIPON, 1986).

1.3.3.3.2 les enzymes protéolytiques et leurs actions :

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

- les protéases indigènes ou natives du lait telles la protéase alcaline, la protéase acide... ;
- les protéases exogènes rajoutées au lait dans le but de le coaguler telles la présure ou les substituts de l'enzyme coagulante ;

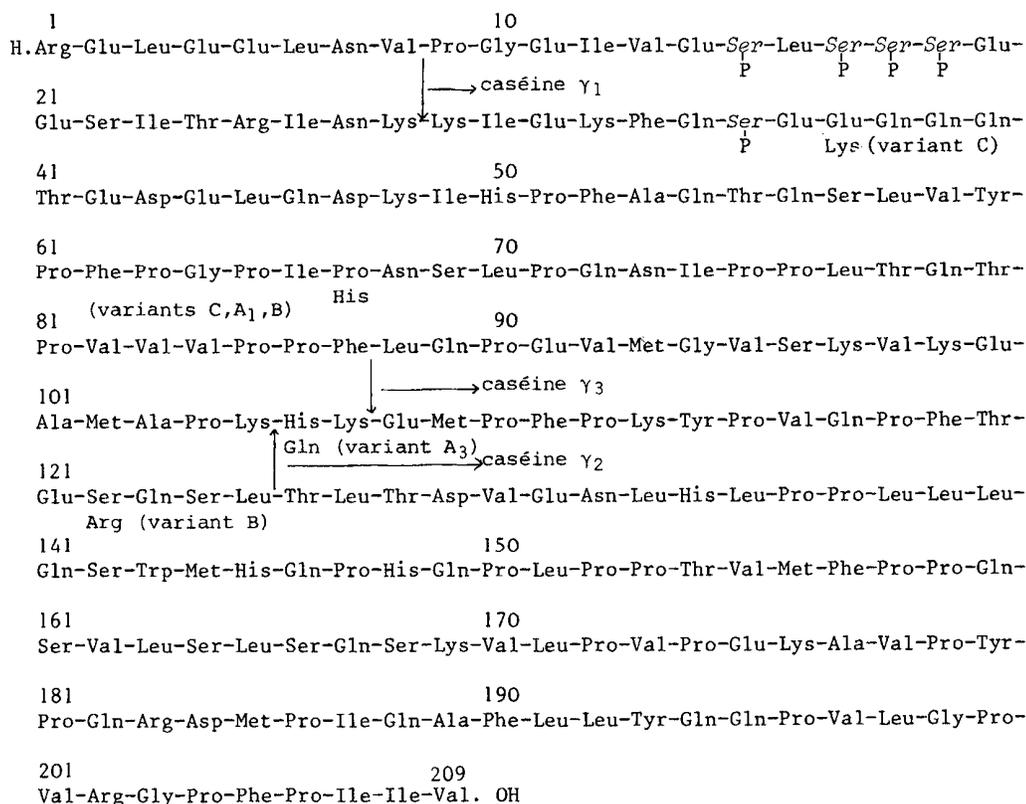


Figure 4 : Structure primaire de la caséine b A₂ bovine (d'après RIBADEAU-DUMAS *et al.* 1972)

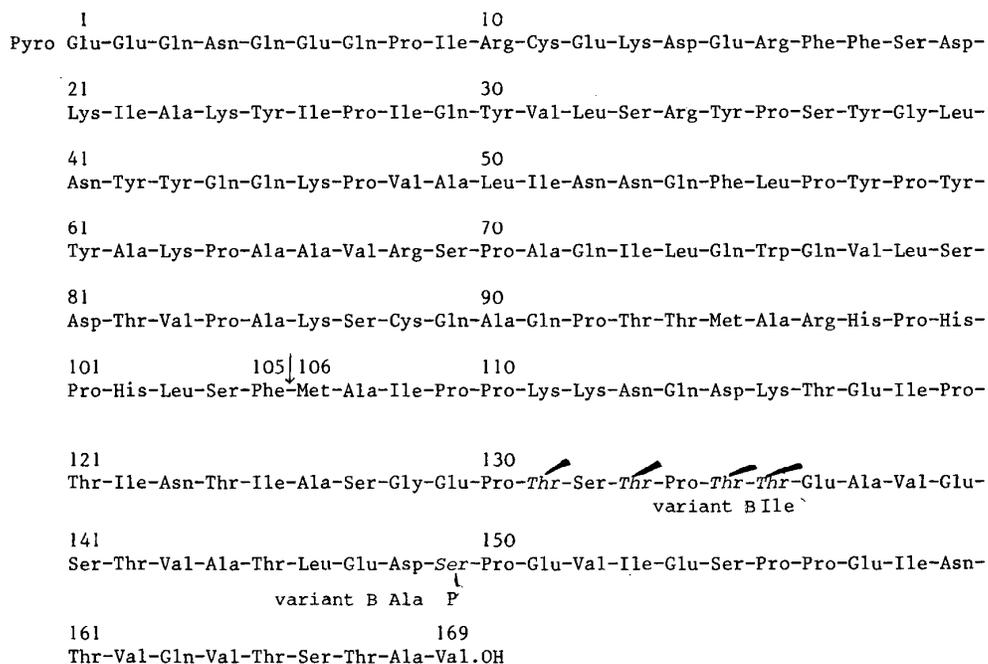


Figure 5 : Structure primaire de la caséine k_A et k_B bovine (d'après MERCIER *et al.* 1973)

↓ : site d'attaque de la chymosine : / : sites possibles de glycosylation



Figure 6 : Structure primaire de la caséine α_1 B bovine (d'après MERCIER *et al*, 1971)
(1) dans la caséine α_{S0} , le résidu séryle 41 est phosphorylé.



Figure 7 : Structure primaire de la caséine α_2 bovine (d'après BRIGNON *et al*, 1977)
Phosphorylation possible des résidus 3, 31, 66, 130 et 154.

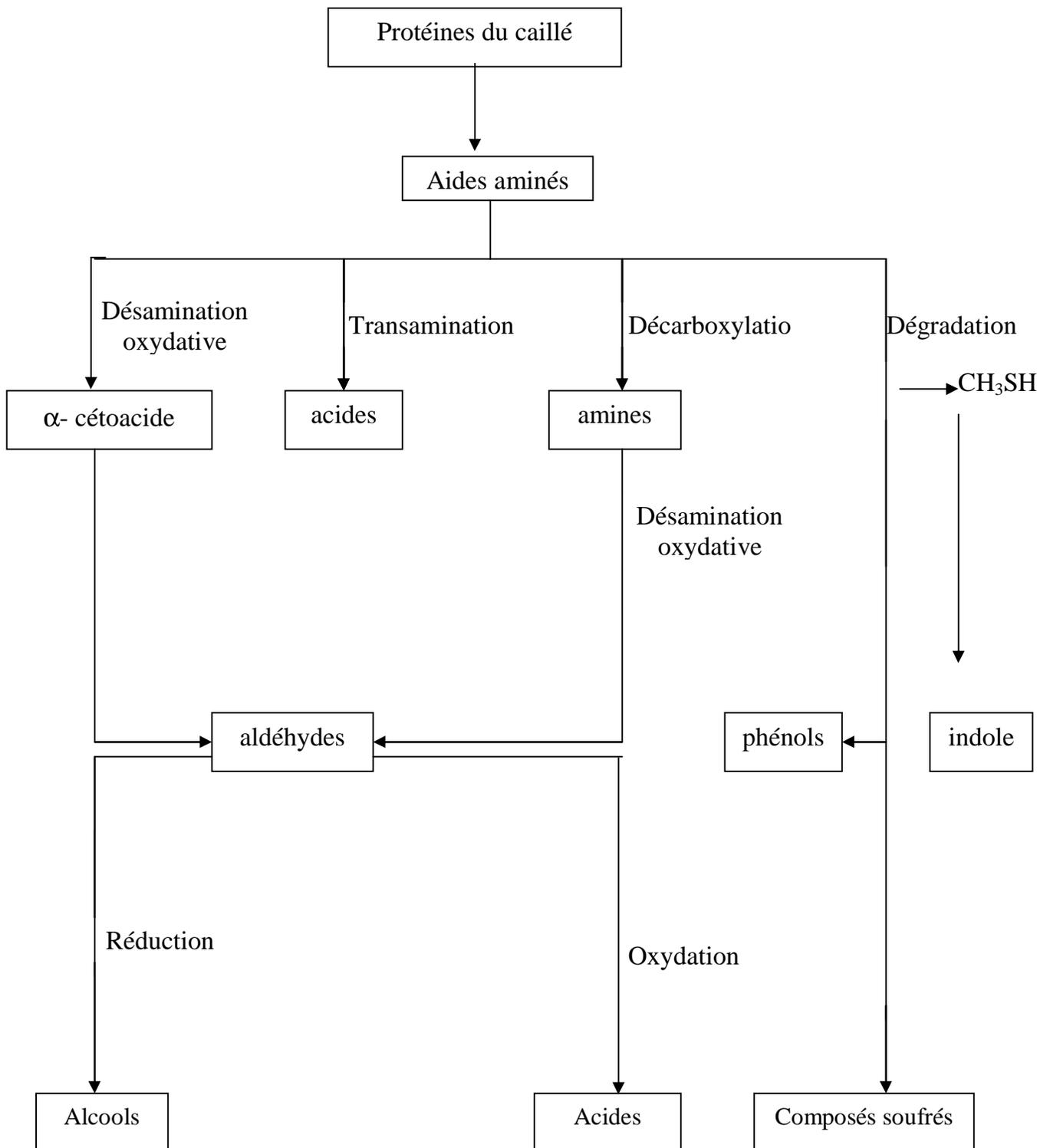


Figure 8 : Schéma général de dégradation microbienne des acides aminés au cours de l'affinage (HEMME *et al*, 1982).

- les protéases endogènes apportées par les micro-organismes du lait (qui subsistent après la pasteurisation). Ces micro-organismes interviennent soit par la libération dans le caillé d'enzymes extracellulaires, soit, après leur lyse, par les enzymes intracellulaires ou liées à leurs enveloppes (DESNOUVEAUX, 1986).

1.3.3.3.2.1. La protéase alcaline (plasmine) :

Cette protéase native du lait présente de fortes analogies avec la plasmine sanguine. Elle appartient au groupe des sérine-protéases et présente une activité de type trypsique. Elle montre une activité maximale à 37°C et à pH 7,4 - 8,0 (HUMBERT et ALAIS, 1979).

Cette enzyme présente une thermorésistance relativement élevée. En effet, selon SNOEREN *et al* (1979), 20% de l'activité protéolytique sont conservés à pH 7 après chauffage du lait à 70°C/ 10 min. La protéase alcaline dégrade préférentiellement la caséine β en caséines γ_1 , γ_2 , γ_3 et protéose-peptones ainsi que la caséine α_{s2} (ANDREWS, 1979). La caséine κ est la plus résistante à la protéolyse. Cette enzyme est sans effet sur les protéines du lactosérum (ANDREWS, 1979).

1.3.3.3.2.2. La protéase acide :

Cette protéase présente une activité maximale à pH 3,5 – 4,0 et à 50°C. Elle agit préférentiellement sur la caséine α_{s1} (NOOMEN *et al*, 1978), sa spécificité sur la caséine κ est comparable à celle de la chymosine (KAMINOGAWA *et al*, 1972). Sa stabilité thermique est assez élevée car un chauffage à 70 °C pendant 10 minutes est nécessaire pour l'inactiver (CHOISY *et al*, 1984).

1.3.3.3.2.3. La présure :

La présure (ou son composant majoritaire la chymosine), qui est une endopeptidase appartenant au groupe des carboxyl-protéases, est le premier agent à intervenir dans les mécanismes d'hydrolyse de la caséine. En effet, elle est rajoutée au lait pour qu'elle intervienne dans la phase de coagulation en clivant spécifiquement la caséine κ au niveau de la liaison PHE₁₀₅-MET₁₀₆.

Cette enzyme exerce au cours de l'affinage, une action de protéolyse générale sur les caséines α_{s1} et β . Deux liaisons sont particulièrement sensibles sur la caséine α_{s1} . Il s'agit de : Phe₂₃ - Phe₂₄ et Phe₂₄ - Val₂₅ dont la rupture produit les peptides 24 – 199 et 25 – 199 qui sont moins hydrophobes que la caséine α_{s1} (VISSER et GROOT-MOSTERT, 1977). Selon ces

auteurs, la coupure de ces liaisons pourrait contribuer aux modifications de texture que l'on observe au cours de l'affinage. Il faut toutefois remarquer que la caséine α_2 et la caséine β sont très résistantes à l'action de la présure (GREEN et FOSTER, 1974).

1.3.3.3.2.4. les protéases d'origine microbienne :

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

1.3.3.3.2.4.1. La flore psychrotrophe :

Les bactéries psychrotrophes du lait cru sont essentiellement des bactéries Gram négatif, se multipliant à une température inférieure à 7°C et dont le genre le plus représentatif est *Pseudomonas fluorescens* (LAW, 1979).

DE BEUCLAR *et al* (1977), ont montré que les protéases des bactéries psychrotrophes présentent une action comparable à celle de la présure. Elles attaquent préférentiellement la caséine κ , puis la caséine β et enfin la caséine α_{s1} . Les protéines du lactosérum non dénaturées sont insensibles à l'action de ces enzymes.

1.3.3.3.2.4.2. La flore lactique :

Constituant la flore dominante de la plupart des fromages, les bactéries lactiques sont des micro-organismes assez hétérogènes qui se caractérisent par une production de quantité plus ou moins importante d'acide lactique. Ces bactéries regroupent un certain nombre d'espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus*.

Il a été montré que l'équipement protéolytique des levains lactiques est faible en comparaison avec celui d'autres groupes bactériens qui est varié et complexe : protéases intra et extra-cellulaires, peptidases intra et extra-cellulaires (THOMAS et MILLS, 1981 ; EXTERKATE, 1983).

VISSER (1977), signale que les bactéries lactiques présentent une action complémentaire à celle de la présure lors de l'affinage. En effet, cette enzyme provoque une première dégradation limitée des caséines en peptides de haut poids moléculaire, suivie d'une protéolyse en peptides plus petits et en acides aminés libres.

La caséine α_{s1} (ou son produit de dégradation par la présure) est principalement attaquée par ces bactéries (DESMAZEAUD *et al*, 1976).

1.3.3.3.2.4.3 La flore secondaire :

Les microcoques constituent l'essentiel de la population non lactique dans les fromages. Certaines corynébactéries et streptocoques du groupe D peuvent également être retrouvés (SCHMIDT et LENOIR, 1978).

Le rôle exact de la flore secondaire dans la dégradation des protéines a été peu étudié et, de ce fait, est moins connu. Cependant, des exopeptidases, qui ont été décrites chez différentes espèces, libèrent des acides aminés dans les fromages à pâte molle (DESMAZEAUD, 1978).

1.3.3.3.2.4.4. Les protéases des levures :

Se développant surtout en surface des fromages au cours des 10 premiers jours de maturation, elles sont douées d'une activité protéolytique intracellulaire appréciable mais variable selon les espèces et les souches. Elles semblent jouer un rôle complexe et significatif dans l'affinage du *Camembert* (DESNOUVEAUD *et al*, 1986).

Le système protéolytique des levures est particulièrement apte à la libération de petits peptides et d'acides aminés (SCHMIDT, 1982).

1.3.3.3.2.4.5. Les protéases de la flore fongique :

GRIPON *et al* (1977) mentionnent que les moisissures jouent un double rôle au cours de l'affinage. D'une part, elles neutralisent les pâtes par désacidification des caillés et par production d'enzymes, d'autre part, elles participent activement aux dégradations qui dominent le processus d'affinage.

Selon LENOIR et AUBERGER (1977), *Penicillium Camemberti* (moisissure type de ce fromage) synthétise deux endopeptidases : une métallo-protéase et une aspartyl-protéase ainsi que plusieurs exopeptidases à activité carbopeptidasique et aminopeptidasique.

Ces endopeptidases dégradent profondément les caséines α_1 et β dans le *Camembert* pour produire des peptides de haut et de bas poids moléculaire et des acides aminés.

Les activités de ces deux enzymes restent faibles à l'intérieur du fromage alors qu'elles atteignent des niveaux sensiblement élevés en surface (DESMAZEAUD *et al*, 1976).

1.3.3.3.3 . Modes d'évaluation de l'activité protéolytique :

Dans la complexité des diverses réactions de transformations qui ont lieu au cours de l'affinage des fromages, il n'est pas toujours aisé de mettre en oeuvre des approches expérimentales qui puissent rendre compte de la nature et de l'importance de ces réactions.

Néanmoins, et afin d'évaluer et de suivre cette étape, particulièrement au niveau de sa phase principale qui est l'activité protéolytique, différentes méthodes analytiques sont proposées avec une variabilité dans leur facilité de mise en oeuvre, leur performance et leur coût.

Nous nous limiterons dans ce qui suit à énumérer certaines d'entre-elles, parmi les plus utilisées pour l'analyse et la quantification de la protéolyse du *Camembert* au cours de la phase d'affinage.

1.3.3.3.3.1. Extraction de l'échantillon :

L'extraction sélective de l'échantillon à analyser est souvent réalisée par des techniques telles : la précipitation par les sels ou les solvants organiques, la filtration (et/ou l'ultrafiltration) et la dialyse.

Les échantillons protéiques sont ainsi séparés des autres contaminants qui se trouvent dans le milieu (lactose, matière grasse, sels...).

1.3.3.3.3.2. Analyse quantitative :

Un grand nombre de protocoles quantifient l'azote dans les fractions protéiques par la méthode de KJELDAHL (WALLACE et FOX, 1994). En effet, cette dernière qui convient à l'analyse de plusieurs types de protéines (sériques, micellaires, membranaires...etc) est d'une grande précision avec une bonne reproductibilité mais, elle demeure une méthode relativement laborieuse à mettre en oeuvre avec l'emploi de réactifs potentiellement dangereux.

D'autres évaluations indirectes sont à ce titre proposées. Elles consistent dans leur principe à :

- la mise en évidence de liaisons particulières (méthode de Biuret) ;
- l'exploitation de l'absorption des rayonnements (absorption dans l'ultra- violet, dans l'infrarouge, fluorométrie ...)
- l'évaluation de radicaux fonctionnels (méthode de LOWRY, méthode de BRADFORD, méthode de fixation de colorant...etc) ;
- enfin, l'utilisation de réactions immunologiques spécifiques.

Parmi ces approches, dont chacune présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients, la méthode de LOWRY *et al.*, (1951) est l'une des techniques les plus utilisées car présentant l'avantage d'être sensible et facile à mettre en œuvre. De plus, elle est bien corrélée à la méthode de KJELDAHL (GUILLOU *et al.*, 1986 ; KAMINOGAWA *et al.*, 1986 ; DELOBETTE *et al.*, 1991).

Au niveau de cette voie d'évaluation, BOUTON et GRAPPIN (1994), ont utilisé le réactif de Folin-Ciocalteu pour le dosage des peptides solubles dans l'acide chloracétique. Néanmoins, ce réactif semble moins sensible que l'acide 2,4,6 – trinitrobenzène - sulfonique (TNBS) qui réagit avec les amines primaires pour produire un composé chromophore qui absorbe à 420 nm (optimum). La réaction est réalisée à pH alcalin et est stoppée par diminution du pH (ARDO et MEISEL, 1991).

1.3.3.3.3. Analyse qualitative :

1.3.3.3.3.1. les techniques électrophorétiques :

L'électrophorèse est le déplacement (migration préférentielle) de particules chargées dans un champ électrique. C'est une technique analytique ou préparative de haute résolution qui peut être réalisée sur plusieurs supports (l'amidon, l'agarose, l'acétate de cellulose, le polyacrylamide...etc).

Ces techniques permettent de suivre la protéolyse des protéines et donnent des informations sur les produits de dégradation (Mc SWEENEY et FOX, 1997).

Les systèmes de séparation monodimensionnels sur gel de polyacrylamide (PAGE) sont à ce titre les plus résolutifs et les plus utilisés par les chercheurs en raison des multiples avantages que présente ce gel en plus du fait qu'il peut servir lui-même de tamis moléculaires.

Ainsi l'électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence d'urée et de β –mercaptoéthanol (PAGE-Urée) est souvent utilisée pour suivre le degré de dégradation des caséines au cours de la maturation du fromage. Alors qu'en présence de détergent ionique du type dodécyl-sulfate de sodium (SDS), l'électrophorèse PAGE-SDS qui en résulte est appropriée pour mettre en évidence les produits issus de la protéolyse de ces caséines.

Avec ce type d'évaluation qualitative, TRIEU- CUOT et GRIPON, (1982) ont utilisé une électrophorèse bidimensionnelle en réalisant une isoélectrofocalisation (IEF) dans une première dimension et une PAGE-SDS dans l'autre dimension perpendiculaire. Ce système

combiné assure une analyse plus performante pour peu que les spots obtenus soient quantifiés par densitométrie.

Par ailleurs, afin d'améliorer la précision et la sensibilité électrophorétique, TIRELI, (1998) a utilisé une électrophorèse capillaire qui se caractérise par une séparation électrophorétique des composés dans un fin capillaire et leur révélation par l'entremise d'un système approprié analogue à celui de la chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

1.3.3.3.3.2 Les méthodes chromatographiques :

Les séparations chromatographiques réalisées dans le but d'analyser les peptides issus de la protéolyse au cours de l'affinage sont de plusieurs types : perméation sur gel, échange d'ion, interaction hydrophobe et chromatographie en phase gazeuse.

En basse pression atmosphérique, ces méthodes présentent certaines limites notamment en ce qui concerne la séparation des produits d'hydrolyse ayant des poids moléculaires (PM) faibles. Pour cette raison, on a recours de plus en plus aux chromatographies se déroulant à des pressions plus élevées (des dizaines de Bars) qui permettent de séparer et de quantifier des fragments de faibles PM.

Ainsi, en phase normale, la chromatographie échangeuse d'ions à haute performance (HPLC) est utilisée pour l'analyse des aminoacides libres dans le fromage. C'est une méthode précise qui requière de petites quantités d'échantillons. Les aminoacides sont souvent détectés par dérivation post-colonne utilisant la ninhydrine (Mc SWEENEY et FOX, 1997).

La chromatographie en phase inverse (RP-HPLC), est aussi une méthode de choix pour suivre l'évolution de la protéolyse des fromages. La détection se fait généralement par spectrophotométrie UV à 280 nm. Un gradient d'élution avec acétonitrile/eau est souvent utilisé. En opérant un choix de colonnes appropriées (C₄, C₈, C₁₈...), il est possible de séparer des composés protéiques de différentes tailles. Cette méthode se caractérise par une sensibilité, une résolution et une reproductibilité élevées. Elle présente néanmoins, l'inconvénient d'être peu accessible par rapport à son coût et à sa mise en œuvre.

II. MATERIEL ET METHODES :

2.1. MATERIEL

2.1.1. Appareillage :

- agitateurs (de tubes type VORTEX, magnétiques, basculants) ;
- bain-Marie ;
- balance de précision (0,01 mg) (SARTORIUS-SE 40E) et balance électronique (0,01g);
- butyromètre de GERBER ;
- centrifugeuse (LABOFUGE max. 15000 x g) ;
- dégazeur à ultrasons ;
- dessiccateur à infra – rouge (DENVER instrument IR – 100) ;
- distillateur d'azote semi-automatique (BUCHI) ;
- évaporateur rotatif ;
- lyophilisateur à plateaux (BETTA) ;
- pH-mètre (METROHM 620) ;
- spectrophotomètre UV- visible (SCHIMADZU) ;
- unité d'électrophorèse verticale sur mini-cuve (HOEFER SE 200 et SE 280)

comprenant :

- couleur de gel ;
- cuves d'électrophorèse (10 x 08 cm et 10 x 12 cm) ;
- générateur de courant (max. 250 V, 100 Ma) ;
- sécheur de gels (GEL DRAYER, modèle : GD – 4535) ;
- plaques en verre, plaques en oxyde d'alumine, espaceurs d'épaisseurs

variées, peignes et pinces.

2.1.2. Autre matériel :

- verrerie (bechers, fioles jaugées, fioles à vide, pipettes graduées, burette de précision, colonne en verre de filtration, coton de verre...etc) ;
- matériel approprié pour l'analyse microbiologique (autoclave, étuves, microscopes...).
- membranes de dialyse, divers types de filtres (coton de verre, papier, membrane de synthèse).

2.1.3. Produits chimiques et réactifs :

* Solvants et réactifs divers :

acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS), bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R 250, dodécyl sulfate de sodium (SDS), persulfate d'ammonium, phénolphtaléine, réactif de Folin-Ciocalteu, tétraéthyl-méthylène diamine (TEMED), Trisma base (TRIS), urée.

* Sels :

acétate de zinc, citrate de sodium, hexacyanoferrate de potassium, permanganate de potassium, sulfate de cuivre, thiosulfate d'ammonium, thiosulfate de sodium.

* Supports d'analyse et produits biologiques:

acrylamide, bis-acrylamide, milieux de culture pour le dénombrement de micro-organismes, l'albumine sérique bovine (BSA).

2.2. METHODES :

2.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons :

Les échantillons de lait et de fromage ayant servi aux différents tests analytiques ont été prélevés à la Laiterie de Draa Ben Khedda. Quand ils ne sont pas analysés sur place, ils sont acheminés dans une glacière au laboratoire.

Le lait destiné à la fabrication du fromage est prélevé après le traitement de pasteurisation à 85 °C pendant 20 secondes.

Deux types d'échantillons de fromages ont été considérés :

- fromage à base de lait frais collecté localement (FLL) ;
- fromage à base de lait mixte (FLM), fabriqué à partir d'un mélange à parts égales entre le lait local et le lait recombinaison.

Les échantillons de *Camembert* ont été prélevés aux stades suivants :

- introduction du fromage au hâloir pour affinage (stade : J = 0) ;
- après 6 jours d'affinage = (J + 6) ;
- après 12 jours d'affinage = (J + 12) ;
- après 15 jours d'affinage = (J + 15) ;
- après 20 jours d'affinage = (J + 20).

Afin d'évaluer l'impact de l'entreposage à basse température sur le produit affiné, des pièces de *Camembert* ont été soumises à une conservation dans une enceinte réfrigérée à des températures comprises entre (6-10°C). Les prélèvements ont été réalisés comme suit :

- après 2 jours d'entreposage au froid = ($J_{er}+2$) ;
- après 4 jours d'entreposage au froid = ($J_{er}+4$) ;
- après 7 jours d'entreposage au froid = ($J_{er}+7$).

Pour l'ensemble de ces prélèvements, les analyses ont été effectuées sur les deux parties du fromage (interne et externe). Selon HASSOUNA *et al* (1996) la partie externe est constituée d'une couronne de 8 mm d'épaisseur. Le reste, forme la partie interne du fromage.

Après prélèvement et homogénéisation au mortier, 10 g de chaque portion de fromage sont dissous dans 40 ml de solution de citrate de sodium à 0,5 %, pH 5,2, préalablement chauffée à 45 °C (SCHMIDT et LENOIR, 1978). Ces solutions lactées vont servir par la suite aux différents dosages.

2.2.2. Analyses physico-chimiques :

Le contrôle physico-chimique permet d'évaluer la stabilité et la consistance du produit en ce qui concerne ses caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques.

2.2.2.1. Détermination de l'acidité :

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

La présence de phénolphtaléine, comme indicateur coloré, indique la limite de la neutralisation par changement de couleur (rose pale). Cette acidité est exprimée en degré Dornic (°D) où : 1 ° D représente 0,1 g d'acide lactique dans un litre de lait (le mode opératoire est donné en annexe 2).

2.2.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode acido – butyrométrique (norme AFNOR, 1980) :

Le principe de cette méthode est basé sur la dissolution du produit à doser (excepté la matière grasse) par l'acide sulfurique. Sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction d'une faible quantité d'alcool isoamylique, la matière grasse se sépare en couche claire dont les graduations du butyromètre révèlent le taux (le mode opératoire est donné en annexe 3).

2.2.2.3. Détermination de la densité :

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

Deux facteurs déterminent cette densité :

- la concentration des éléments dissous et en suspension ;

- la proportion de la matière grasse.

2.2.2.4. Détermination de l'extrait sec total (EST) :

L'extrait sec total est déterminé à l'aide d'un dessiccateur infrarouge. Le principe consiste à sécher l'échantillon par l'émission de radiations infrarouges et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance intégrée. Le pourcentage d'humidité ou de solide est calculé par la différence entre le poids humide initial et le poids sec final.

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

2.2.2.5. Détermination de la teneur en lactose (méthode de BERTRAND, 1988) :

Cette méthode repose sur la défécation du lait par l'héxacyanoferrate de zinc. Une solution tartro-alcaline est réduite à chaud par le filtrat obtenu. Le précipité d'oxyde cuivreux formé est dosé par le permanganate de potassium. Le mode opératoire est donné en annexe 4.

2.2.2.6. Détermination de la teneur en chlorures (norme AFNOR, 1980) :

Le principe repose sur la dissolution de la matière organique du fromage par le permanganate de potassium et l'acide nitrique puis détermination de la teneur en chlorures par titrage argentimétrique dans une solution d'acide nitrique en présence d'ammonium et de fer III comme indicateur (annexe 6).

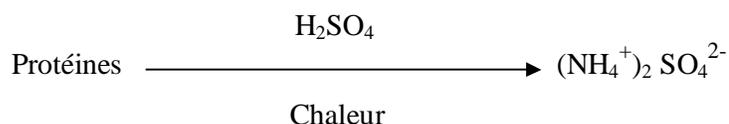
2.2.2.7. Détermination de la teneur en protéines :

2.2.2.7.1. Dosage de l'azote (méthode de Kjeldahl):

L'azote est dosé selon la méthode de Kjeldahl qui est une méthode de référence. Son principe peut être subdivisé en trois étapes :

- **minéralisation :**

La matière organique est détruite à chaud par l'acide sulfurique concentré. L'azote se retrouve sous forme de sulfate d'ammonium :



- **Distillation :**

L'ammoniac (du sulfate d'ammonium) est déplacé par une solution d'hydroxyde de sodium concentré puis entraîné par la vapeur d'eau :



- Titration :

L'ammoniac est distillé et titré par une liqueur d'acide sulfurique centinormale en présence de 5 ml d'indicateur coloré. Le mode opératoire est donné en annexe 7.

Le taux protéique est déterminée en utilisant un facteur de conversion égal à 6,38.

2.2.2.7.2. Dosage des protéines (méthode de LOWRY *et al*, 1951) :

L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine (DELOBETTE *et al*, 1991).

Les espèces réduites absorbent à 750 nm. A cette longueur d'onde, le spectrophotomètre donne une valeur de densité optique (DO) qui permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage $DO = f(c)$ où l'albumine sérique bovine commerciale est utilisée comme protéine étalon (Figure 9) (le mode opératoire est donné en annexe 5).

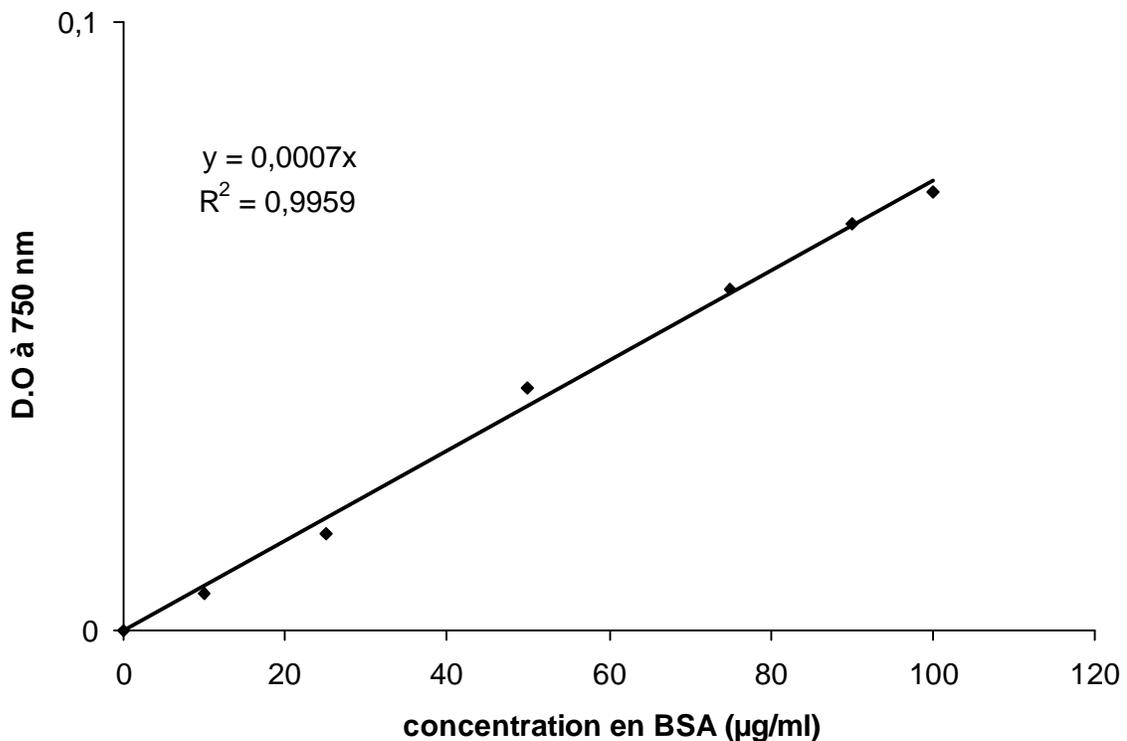


Figure 9 : Courbe étalon $DO = f[B.S.A]$ pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951).

2.2.3. Effet du traitement de pasteurisation :

L'effet du traitement de pasteurisation appliqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda et ses répercussions sur la solubilité des protéines sériques a été examiné sur trois types d'échantillons : le lait cru (à 100%) collecté localement (LC), le lait recombinaison à 100 % (LR) et les mélanges (LC/LR, 25/75 ; 50/50). Les échantillons sont prélevés avant et après la pasteurisation à 85°C pendant 20 secondes.

L'effet du traitement thermique est mesuré par le dosage des protéines solubles et par l'analyse du comportement électrophorétique des protéines sériques sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native).

Le pourcentage des protéines dénaturées (PrD) est déterminé par la relation :

$$\text{PrD} = (\text{Pr} - \text{PrT}) \times 100 / \text{Pr}$$

Pr = quantité de protéines (g/l) avant chauffage ;

PrT = quantité de protéines (g/l) après chauffage.

Notons que l'évaluation de l'efficacité du traitement de pasteurisation peut être réalisée par des tests rapides consistants à mesurer la sensibilité de certaines enzymes type lactoperoxydase et phosphatase alcaline qui sont normalement détruites dans le cas d'un traitement de pasteurisation bien conduit.

2.2.4. Analyses microbiologiques de la flore intervenant au cours de l'affinage :

Afin de suivre l'évolution de la microflore au cours de l'affinage et son incidence sur le phénomène de protéolyse, nous avons recherché les groupes microbiens suivants :

- la flore totale aérobie mésophile ;
- les bactéries lactiques ;
- la flore halotolérante ;
- les levures et moisissures.

Se basant sur des analyses préliminaires, nous n'avons pas pris en considération les autres groupes microbiens, (notamment les entérobactéries) car nous avons estimé que les faibles proportions qu'ils constituent ne sont pas de nature à peser considérablement sur la phase d'affinage. De même, pour la flore psychrotrophe, elle n'a pas été prise en considération vu que le lait n'a pas été stocké assez longtemps à basse température pour que ces germes puissent se développer.

2.2.4.1. La flore mésophile totale :

La flore mésophile, (également désignée : germes aérobies totaux) est l'ensemble des germes aptes à se multiplier à l'air libre avec une croissance optimale à 30°C (LECLERC et MOSSEL, 1989).

Après incubation pendant 72 heures à cette température, les micro-organismes aérobies et anaérobies facultatifs, se développent sur un milieu nutritif non sélectif (gélose nutritive) et apparaissent sous forme de colonies de tailles et de formes différentes (annexe 10).

2.2.4.2. La flore lactique :

Elle est constituée essentiellement des genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Leur recherche est importante car ce sont des germes utiles dans l'affinage. Leur quantification permet le suivi de la maturation du fromage, particulièrement de la protéolyse.

2.2.4.2.1. Dénombrement des Streptocoques lactiques :

Le principe de ce dénombrement repose sur l'utilisation du milieu spécifique (milieu M17) rendu sélectif par addition d'acide nalidixique. L'incubation a lieu à 25°C pendant 72 heures (BOURGEOIS et LEVEAU, 1991) (voir annexe 11).

2.2.4.2.2. Dénombrement des Lactobacilles :

Le dénombrement de cette flore repose sur l'utilisation du milieu MRS (De Man, Rogosa, et Sharp) avec incubation à 37°C pendant 48 heures. Ce milieu tient compte des caractères acidogènes et acidophiles ainsi que des exigences nutritionnelles de ces germes (BOURGEOIS et LEVEAU, 1991) (voir annexe 12).

2.2.4.3. La flore halotolérante :

Elle est principalement constituée de microcoques, de bactéries corynéformes et de streptocoques fécaux. Ce sont des germes aérobies et acido-sensibles se développant principalement en surface. Cette flore constitue un sérieux concurrent numérique aux bactéries lactiques.

Le principe de ce dénombrement repose sur l'utilisation du milieu hypersalé de CHAPMAN (ou Manitol Salt Agar) où le développement des autres micro-organismes est freiné par le sel. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 heures (annexe 13).

2.2.4.4. Les levures et moisissures :

Les levures et moisissures sont des micro-organismes unicellulaires et filamenteux, se développant dans les milieux acides (pH inférieur à 4,5) et à une température comprise

entre 20 et 25 °C. Ces micro-organismes peuvent provoquer des accidents de fabrication comme la détérioration du goût, le gonflement et le défaut de texture.

Le principe de ce dénombrement repose sur l'utilisation d'un milieu rendu sélectif par addition d'antibiotiques tel que le milieu dit gelosé à l'oxytétracycline glucose ogar (OGA) (le mode opératoire est donné en annexe 14).

2.2.5. Evaluation du degré de la protéolyse :

2.2.5.1. Evaluation qualitative par suivi du comportement électrophorétique :

2.2.5.1.1. Préparation des échantillons protéiques:

2.2.5.1.1.1. Echantillons de lait :

La préparation de l'échantillon destiné à l'analyse électrophorétique se fait en plusieurs étapes (figure 10) dont notamment:

- l'écémage :

Il s'effectue par centrifugation à 3500 x g pendant 20 min et filtration sur du coton de verre. Le lait est porté préalablement au bain-Marie à 30-35°C et agité légèrement pour favoriser la remontée de matière grasse en surface.

- la séparation des protéines majeures du lait :

Les caséines sont précipitées à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique (4N). Elles sont ensuite séparées des protéines solubles qui restent en suspension, par centrifugation à 3500 x g /15 min. Cette opération est refaite deux fois pour éliminer toute trace de caséines et de protéines sériques respectivement dans les surnageants et dans les culots de centrifugation.

- la dialyse :

Les échantillons de protéines totales du lait, de caséines et de lactosérum sont mis dans des boudins de dialyse semi-perméable ayant un seuil d'exclusion de 10 000 Daltons (Da). Ils sont alors dialysés contre l'eau distillée pendant 72 heures (avec changement de l'eau deux fois par jour) afin d'éliminer les composés azotés non protéiques, le lactose et les sels minéraux ...etc.

- congélation et lyophilisation :

Après dialyse, les échantillons de protéines sont mis en une fine couche liquide dans des coupelles appropriées puis congelés sous cette forme à -20°C. Ils sont déposés sur le plateau du lyophilisateur. Celui-ci permet par sublimation le passage de l'eau directement de l'état solide à l'état gazeux. Les protéines sont alors récupérées sous forme de poudre qui peut être conservée au frais pendant une période relativement longue.

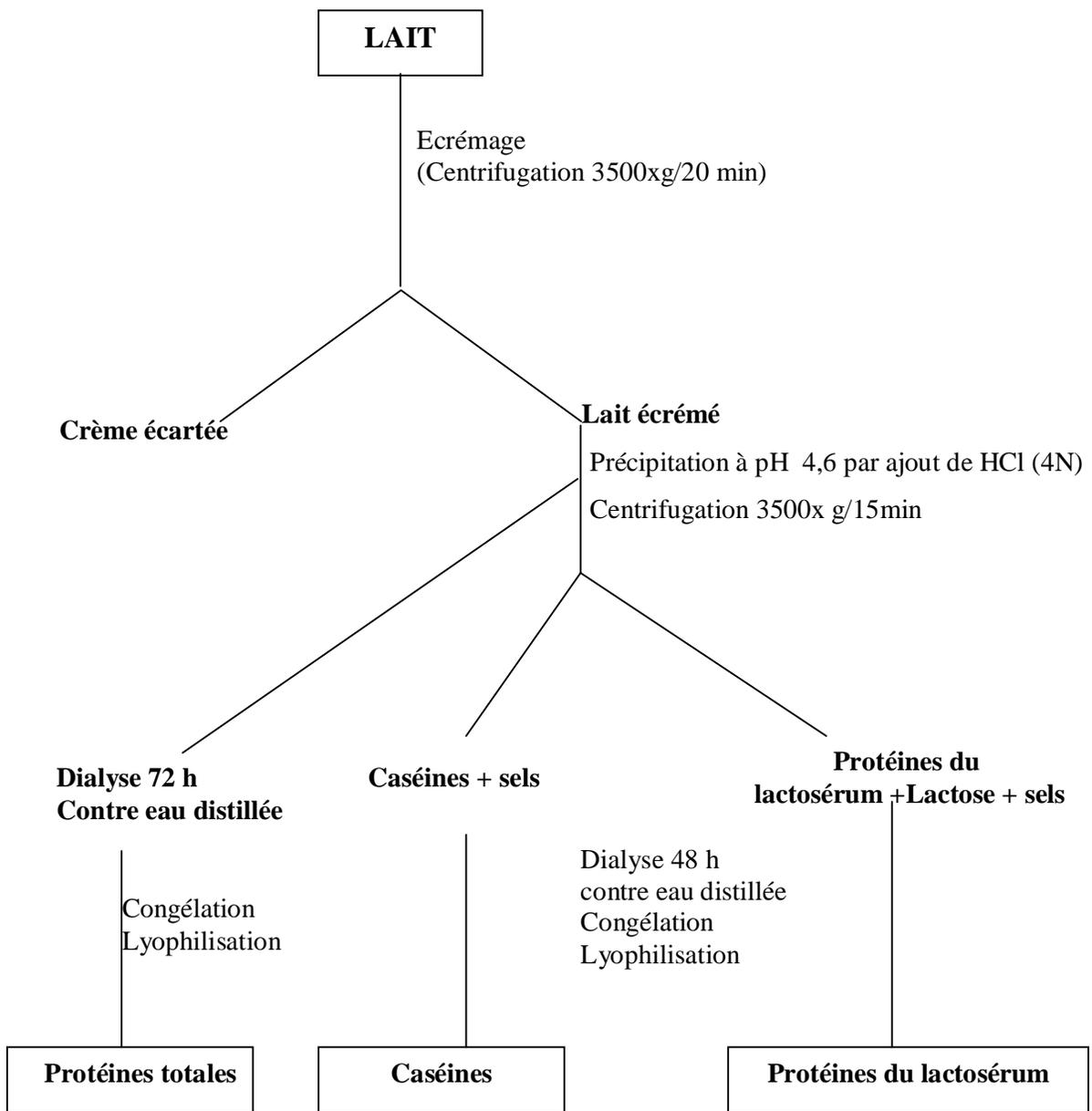


Figure 10: Protocole d'isolement des protéines du lait.

2.2.5.1.1.2 Echantillons de fromage :

La préparation des échantillons de fromage destinés à l'analyse électrophorétique est réalisée selon les étapes résumées sur la figure 11.

- découpage, broyage et préparation de la solution aqueuse :

Des portions d'environ 25 g de fromage sont découpées puis broyées dans un mortier. Environ 10 g de cette préparation sont dissous dans un tampon de citrate de sodium (0,5 %), puis transvasés sans pertes dans une fiole jaugée de 100 ml.

- séparation des protéines majeures:

10 ml de la solution aqueuse à 10% (débarassée de la plus grande partie de la matière grasse par centrifugation à (2500xg/20 min) sont ajustés à pH 4,6 avec HCl (1N) puis centrifugés 3 minutes à 3000xg. Le culot obtenu est solubilisé avec 10 ml de tétrachlorure de carbone (CCl₄) puis agité fortement pour dissoudre la matière grasse restante. Après une centrifugation à 3000 x g/5min, le surnageant est recueilli et mis dans des tubes eppendorf puis il est conservé au congélateur.

2.2.5.1.2. Contrôle électrophorétique :

2.2.5.1.2.1. Définition et principe:

Soumise à un champ électrique et, du fait de son caractère amphotère, une protéine migrera selon sa charge globale et sa forme moléculaire, soit vers l'anode (charge globale négative) soit vers la cathode (charge positive), d'autant plus vite que cette charge est élevée. La charge nette de la protéine peut être modifiée par le pH du tampon d'électrophorèse.

Avec un tampon de pH 8,6, les protéines majeures du lait ont une charge négative et migrent alors vers l'anode (GUILLOU *et al*, 1976).

L'électrophorèse sur support solide est constituée d'un gel dans lequel sont déposés des échantillons et dont les deux extrémités opposées sont en contact avec une solution tampon ou baignent les électrodes.

Elle est réalisée sur des supports inertes dont les principaux sont : le papier, l'agarose, l'amidon, l'acétate de cellulose et enfin le polyacrylamide. C'est ce dernier support que nous avons utilisé pour les besoins de séparation des échantillons protéiques.

2.2.5.1.2.2. Propriétés générales :

Le gel de polyacrylamide est le produit de polymérisation du monomère d'acrylamide (CH₂=CH-CO-NH₂) et d'un agent de pontage habituellement le comonomère

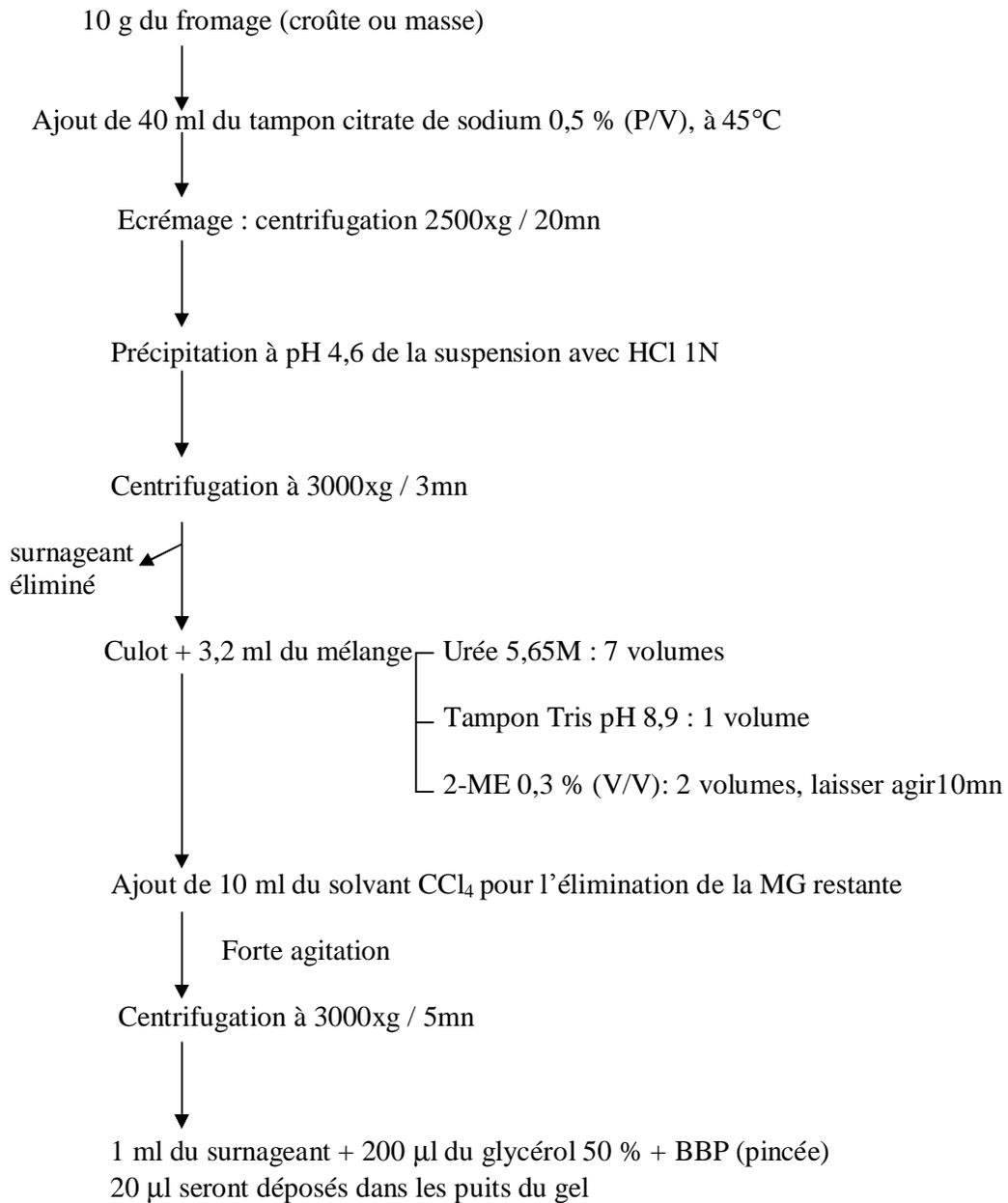


Figure 11 : Etapes suivies pour la préparation des échantillons de fromage destinés à l'analyse électrophorétique PAGE-Urée.

N, N'- méthylène-bis-Acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) et ce en présence de catalyseurs fournissant des radicaux libres dont les plus utilisés sont le persulfate d'ammonium et le N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED).

La concentration en monomères et comonomères conditionnent pour une large part la taille des pores du gel qui est souvent définit par les indices T et C.

$$T = (a + b / v) \times 100 \% ; C = (b / a + b) \times 100 \%$$

a = Acrylamide (g)

b = N, N' méthylène – bis – Acrylamide

v = volume du tampon (ml).

2.2.5.1.2.3. Conduite de l'électrophorèse :

L'électrophorèse est menée dans un système de mini-cuves verticales en mettant en œuvre différentes étapes dont notamment :

- préparation du gel de polyacrylamide :

La solution d'acrylamide est introduite dans une fiole à vide. Elle est dégazée pendant 2 à 3 min avec l'aide d'un laveur à ultrasons. Elle est ensuite additionnée de TEMED et de persulfate. Ce mélange est coulé entre les deux plaques de la cuve d'électrophorèse. Un peigne (qui formera des puits après polymérisation du gel) est introduit en haut de la cuve. La polymérisation du gel est effective après 10 à 15 min.

- dépôt des échantillons :

L'échantillon est déposé à raison de 15 à 20 μl (d'une solution à 1-2 mg / ml) dans chaque puit à l'aide d'une micro-seringue. Le gel est ensuite introduit dans l'unité d'électrophorèse et les cuves (inférieure et supérieure) sont remplies de tampon d'électrodes. L'unité est alors mise sous tension appropriée (courant et voltage constants).

- révélation des protéines :

Les protéines contiennent de nombreux groupements azotés qui vont être colorés par le bleu de Coomassie après une fixation par une solution d'acide trichloroacétique à 12 % (P/V) pendant 45 min.

Les entités protéiques seront visualisées sur le gel par les bandes de migration apparentes.

2.2.5.1.2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native) :

Cette méthode préconisée par HILLIER (1976) est adaptée surtout pour les protéines du lactosérum qui migrent en fonction de leurs poids moléculaires et de leurs charges à travers les pores du gel (le mode opératoire est donné en annexe 16).

2.2.5.1.2.5. Electrophorèse en condition dissociantes et dénaturantes en présence d'urée et du b-mercaptoéthanol (PAGE-Urée) :

C'est une technique qui permet généralement de dissocier les protéines en leurs sous-unités et de mettre ainsi ces dernières en évidence. Du fait de leur structure particulière (type pelotes statistiques), la PAGE – Urée est particulièrement adaptée pour des caséines. Le mode opératoire est donné en annexe 17.

La PAGE-Urée est réalisée avec un système de mini-cuves horizontales. Elle est conduite selon la méthode d'ANDREWS (1983) en utilisant un système de deux gels complémentaires :

- un gel de concentration (T = 4,81% et C = 2,7%) en tampon (urée, 0,8 M et Tris, 0,49 M, pH 6,8)
- un gel de séparation (T = 15% et C = 4%) en tampon (urée, 4 M et Tris, 1,50 M, pH 8,8).

A la fin de l'électrophorèse, les protéines seront révélées par :

- fixation dans une solution de TCA à 12% (P/V) pendant 45 min ;
- coloration pendant deux heures par le bleu de Coomassie R 250 dissout à raison de 0,2 % (P/V) dans une solution constituée d'eau distillée (1 volume), de méthanol (1 volume) et de TCA à 2% (P/V) ;
- décoloration par immersion dans un mélange (eau / méthanol / acide acétique) dont les proportions : 1,50 / 3,12 / 0,37 (V / V / V) ;
- enfin, séchage et conservation du gel.

Les solutions et étapes suivies pour ces deux types d'électrophorèse sont résumées sur la figure 12.

2.2.5.2. Evaluation quantitative de la protéolyse :

2.2.5.2.1. Dosage des groupements NH₂ libres par l'emploi de l'acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS):

Le dosage des groupements NH₂ libres par le TNBS est une méthode spectrophotométrique adaptée à l'évaluation de la protéolyse lors de la maturation du fromage. En effet, des groupes α - aminés libérés par suite de l'hydrolyse des protéines réagissant avec le TNBS pour donner des complexes trinitrophenylés jaunes, qui absorbent massivement à 420 nm :

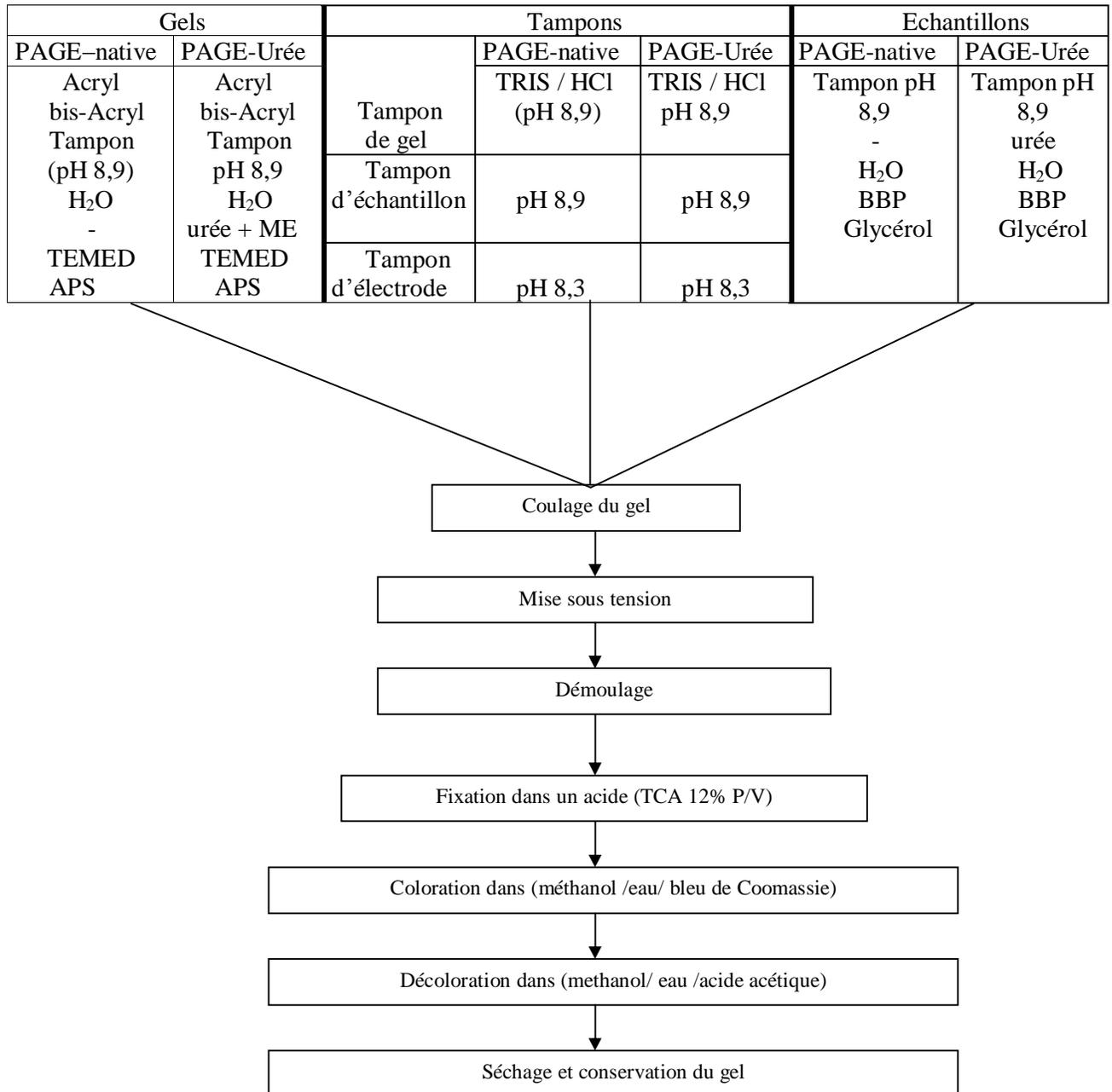
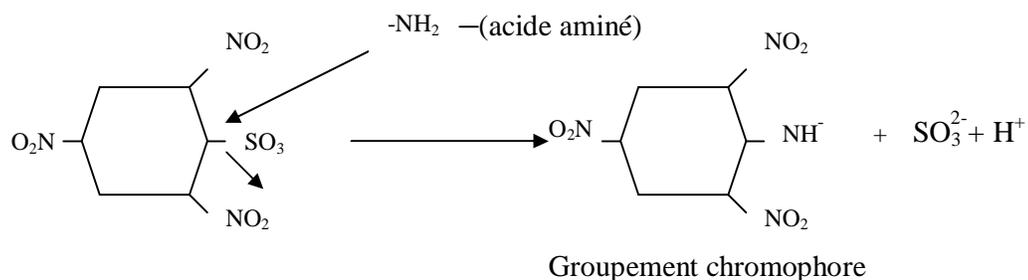


Figure 12 : Solutions et étapes suivies pour la réalisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-native) ou en présence d'urée (PAGE-Urée).

APS : persulfate d'ammonium ;

BBP : bleu de bromophénol.



Pour cette réaction se déroulant en milieu basique (et sera donc inhibée par un abaissement de pH), il existe une relation linéaire entre l'intensité de la réaction et la concentration en groupements α -aminés existant (ADLER et NISSEN, 1979).

Nous avons utilisé la méthode de KUCHROO *et al* (1983) telle qu'elle a été optimisée par POLYCHRONIADOU (1988), sauf que pour la dilution de la prise d'essai, nous avons pris 1/25 de la solution fromagère.

La réaction se développe en présence de 0,5 ml de la dilution précitée, auquel on ajoute 0,5 ml du tampon borate (pH 9,5) et 1 ml de la solution aqueuse à 0,1% (P/V) du réactif (TNBS). Le mélange est incubé à 37°C pendant une heure. La réaction est stoppée par rajout d'une solution phosphate/sulfite (le mode opératoire est donné en annexe 8).

Le spectrophotomètre donne une valeur de densité optique (DO) qui permet de déterminer la concentration en groupes α - aminés libres de l'échantillon analysé en se référant à une courbe d'étalonnage $DO = f(C)$ (POLYCHRONIADOU, 1988) (figure 13).

Nous avons réalisé une courbe d'étalonnage avec la glycine (0 à 0,5 mM). Le taux de groupements (NH_2) est ainsi exprimé en mmoles d'équivalents glycine/gramme d'extrait sec.

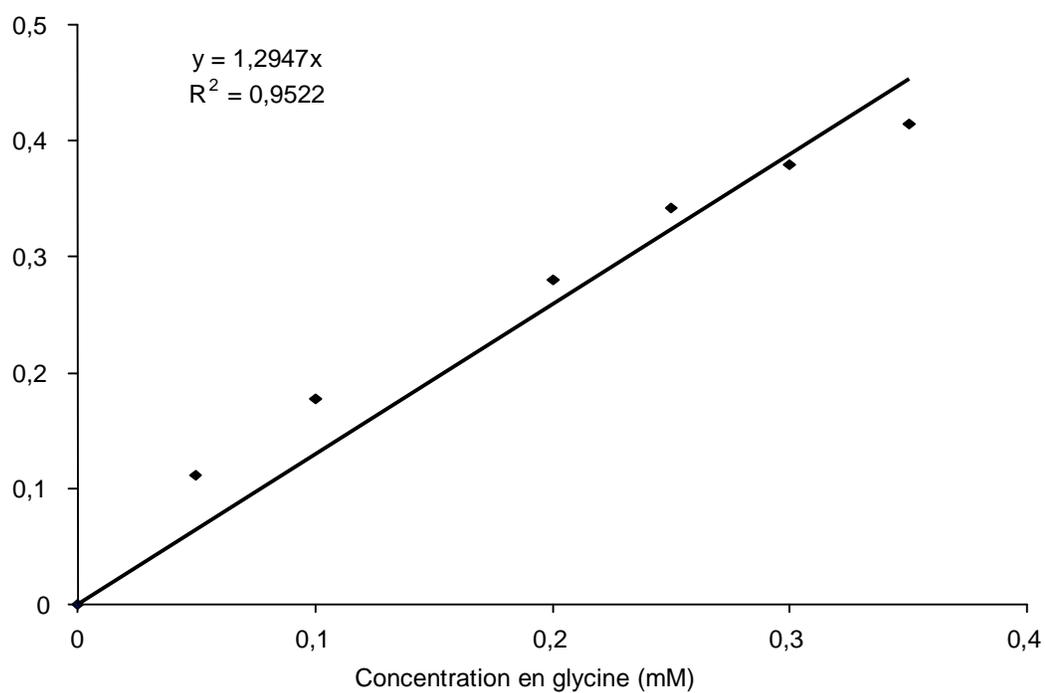


Figure 13 : Courbe étalon pour le dosage des groupements a aminés libres par l'emploi de l'acide 2.4.6 trinitrobenzène sulfonique (T.N.B.S).

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS :

3.1. Nature de la matière première et effet du traitement de pasteurisation :

Afin de mieux cerner les données relatives à la nature du lait de départ et ses répercussions sur la fabrication du fromage à pâte molle type *Camembert*, nous avons choisi de regrouper et de présenter dans cette partie les éléments en rapport avec la situation réelle de transformation industrielle du lait en fromage telle que pratiquée à la Laiterie de Draa Ben Khedda en mettant en relief les aspects positifs et les contraintes de cette technologie.

3.1.1. Présentation sommaire de l'unité :

La Laiterie de Draa Ben Khedda est une unité fromagère située à la sortie ouest de la ville. Elle a été mise en service au mois d'octobre 1974.

A l'heure actuelle, le volume de production est de 300 000 litres de lait par jour, avec un effectif de 360 travailleurs permanents.

L'unité commercialise les différents produits suivants : le lait pasteurisé, le lait fermenté (leben), le fromage fondu, le *Camembert* (Cigogne) fabriqué entièrement à partir du lait de vache frais, le *Camembert* (Tassili) fabriqué à base de lait mixte (lait frais + lait recombinaison).

Le tableau VII donne quelques détails concernant l'évolution de la production du *Camembert* durant les quatre dernières années.

3.1.2. Diagramme de fabrication et ses particularités :

La fabrication industrielle du fromage à pâte molle type *Camembert* est rendue possible par la maîtrise du processus technologique dont les étapes clés sont comparables à celles utilisées dans les fabrications traditionnelles en Normandie qui ont permis de donner une renommée à ce fromage. Ainsi, la figure 14 illustre le diagramme de fabrication du *Camembert* tel qu'il est suivi à la Laiterie de Draa Ben Khedda. Les observations suivantes inhérentes à ce diagramme peuvent être relevées :

- les deux matières de base (lait frais à 100 % et lait mixte) subissent une pasteurisation à 85°C pendant environ 20 secondes. Ce traitement de pasteurisation haute, dont l'efficacité est rendue possible par le biais de l'obtention d'une température élevée pendant un temps de contact réduit ("HTST"), a été adopté à l'unité du fait de la charge microbienne du lait cru, généralement élevée, surtout durant la période printemps – été (IABADENE, 2000). Nous examinerons plus loin les effets induits par un tel traitement sur la qualité du produit ;

Tableau VII : Evolution de la production du fromage *Camembert* à la Laiterie de Draa Ben Khedda durant les quatre dernières années (chiffres exprimés en nombre de pièces de fromage).

Année Produit	1999	2000	2001	2002 (jusqu'au mois d'août)
Camembert Tassili (GM = 250g)	1 683 145	1 647 955	1 807 198	1 120 193
Camembert Tassili (PM = 180g)	432 027	474 632	201 865	142 984
Brie galette (1200-1500g)	32 331	45 032	30 867	18 614
Brie portion (145g)	76 348	43 586	7 671	1 200
Fromage Cigogne (GM = 250g)	189 673	161 076	200 266	68 821
Fromage Cigogne (PM = 180g)	11 388	12 837	20 281	15 748
Equivalent en lait (litres)	4 936 143, 60	4 983 269, 8	4 767 275, 6	2 862 288, 8

GM : grand model ;

PM : petit model.

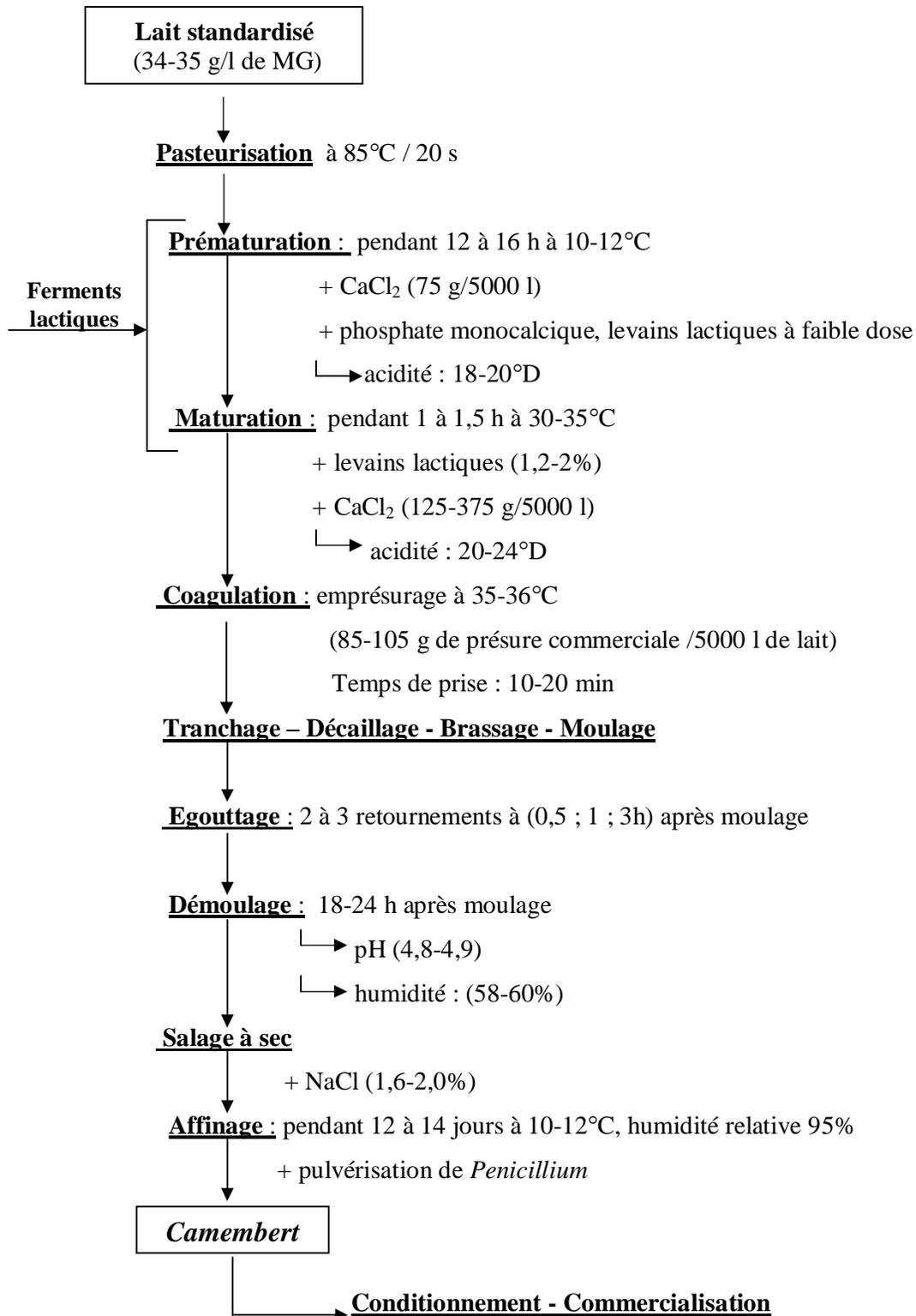


Figure 14 : Diagramme de fabrication du fromage à pâte molle type *Camembert* à la Laiterie de Draa Ben Khedda.

- Le lait est additionné de chlorure de calcium (CaCl_2) au début de la prématuration et du phosphate monocalcique. Selon AMRAM *et al* (1982) et REMEUF (1994), le CaCl_2 a pour effets, la réduction de la résistance du gel, l'accroissement de la vitesse de raffermissement, une meilleure cohésion du caillé et une forte diminution des pertes du coagulum dans le sérum ;

- la coagulation pratiquée à l'unité est de type mixte. Elle est réalisée, d'une part, par les levains lactiques (production d'acide lactique et acidification du milieu) et, d'autre part, par l'action de l'enzyme coagulante : la présure (représentée dans sa grande majorité par la chymosine).

Ces deux ingrédients biologiques (bactéries lactiques et présure), nécessaires à l'obtention du coagulum, sont d'origine commerciales. Ils proviennent de produits d'importation, sélectionnés et livrés sous forme de poudres lyophilisées.

Cet état de fait n'est pas de nature à garantir une stabilité dans la qualité du produit fabriqué en raison de la variabilité née de la nature, de l'origine et du conditionnement de ces ingrédients ;

- enfin, après pulvérisation superficielle par des spores de *Penicillium*, le fromage est affiné dans les hâloirs pendant des durées n'excédant pas 15 jours. Ce temps de maturation, relativement réduit (comparativement à celui signalé dans la littérature qui se situe autour de 30 jours), n'est pas sans répercussions sur l'expression des caractéristiques intrinsèques recherchées du *Camembert*.

3.1.3 Nature de la matière première :

3.1.3.1 Lait cru :

Il est collecté au niveau des fermes d'élevage situées dans la région. Le lait est acheminé à l'usine le jour même dans des camions frigorifiques. Il subit un contrôle sommaire de sa qualité. Généralement le lait de bonne qualité hygiénique (relativement non chargé) est destinée à la fromagerie. Ce lait est stocké au besoin à basse température avant qu'il ne soit pasteurisé et transformé en fromage.

3.1.3.2 Lait recombinaison :

La recombinaison est une opération qui consiste à réobtenir du lait en opérant des mélanges appropriés de ces différents constituants qui sont : la poudre de lait, la matière grasse laitière anhydre (M.G.L.A) et l'eau de reconstitution.

Notre pays a recours à ce type de matière première (importation sous forme de poudre lyophilisée et de MGLA) pour compenser le déficit de la production en lait cru qui ne couvre qu'environ 40 % des besoins.

Concernant la poudre de lait, elle est obtenue par déshydratation où notamment le procédé « SPRAY » est le plus utilisé. Il consiste à pulvériser à l'état de brouillard, le lait dans une chambre parcourue d'un courant d'air chaud (150 – 160 °C).

Il est utile de signaler qu'au niveau technologique, la poudre de lait peut être classée en deux ou trois catégories (figure 15) selon l'intensité des traitements thermiques subis au cours du séchage :

- traitement thermique à température modérée (" low heat" et " medium heat") ;
- traitement thermique à haute température, (" high heat").

La poudre de lait la plus indiquée pour la fromagerie est généralement celle ayant subi un traitement thermique modéré. Ce dernier est de nature à apporter le moins de préjudices induit au lait tant sur le plan de sa valeur nutritionnelle que de ses caractéristiques physico-chimiques et de ses aptitudes technologiques.

Pour la matière grasse laitière anhydre, elle présente une composition globale estimée selon BERTRAND (1988) à :

- 0,1 % d'eau ;
- 0,1 % au maximum d'extrait sec non gras ;
- 99,8 % de matières grasses dont 0,3 % d'acides gras libres.

Cette matière permet de préparer à l'usine un produit ayant une composition similaire à celle du lait cru. L'avantage d'incorporer la MGLA au lait est de standardiser ce dernier s'il a un taux initial faible en matière grasse.

Selon ELSHIEKH *et al* (1994), l'utilisation du lait recombinaison en fromagerie pose certains problèmes. Le coagulum obtenu à partir de ce lait est fragile et friable, de plus une certaine quantité de matière sèche se perd dans le lactosérum.

ECK, (1987) souligne à cet effet qu'un mélange de lait frais en quantité inférieure ou égale à celle du lait recombinaison améliore la cohésion du caillé. Les problèmes de fabrication sont beaucoup plus faciles à résoudre par rapport au lait recombinaison seul.

3.1.4 Analyses physico-chimiques du lait destiné à la fromagerie:

Au regard des résultats des analyses physico-chimiques consignés sur le tableau VIII, nous pouvons conclure que les valeurs obtenues, aussi bien pour le lait cru que pour le lait mixte, se situent dans les limites tolérées.

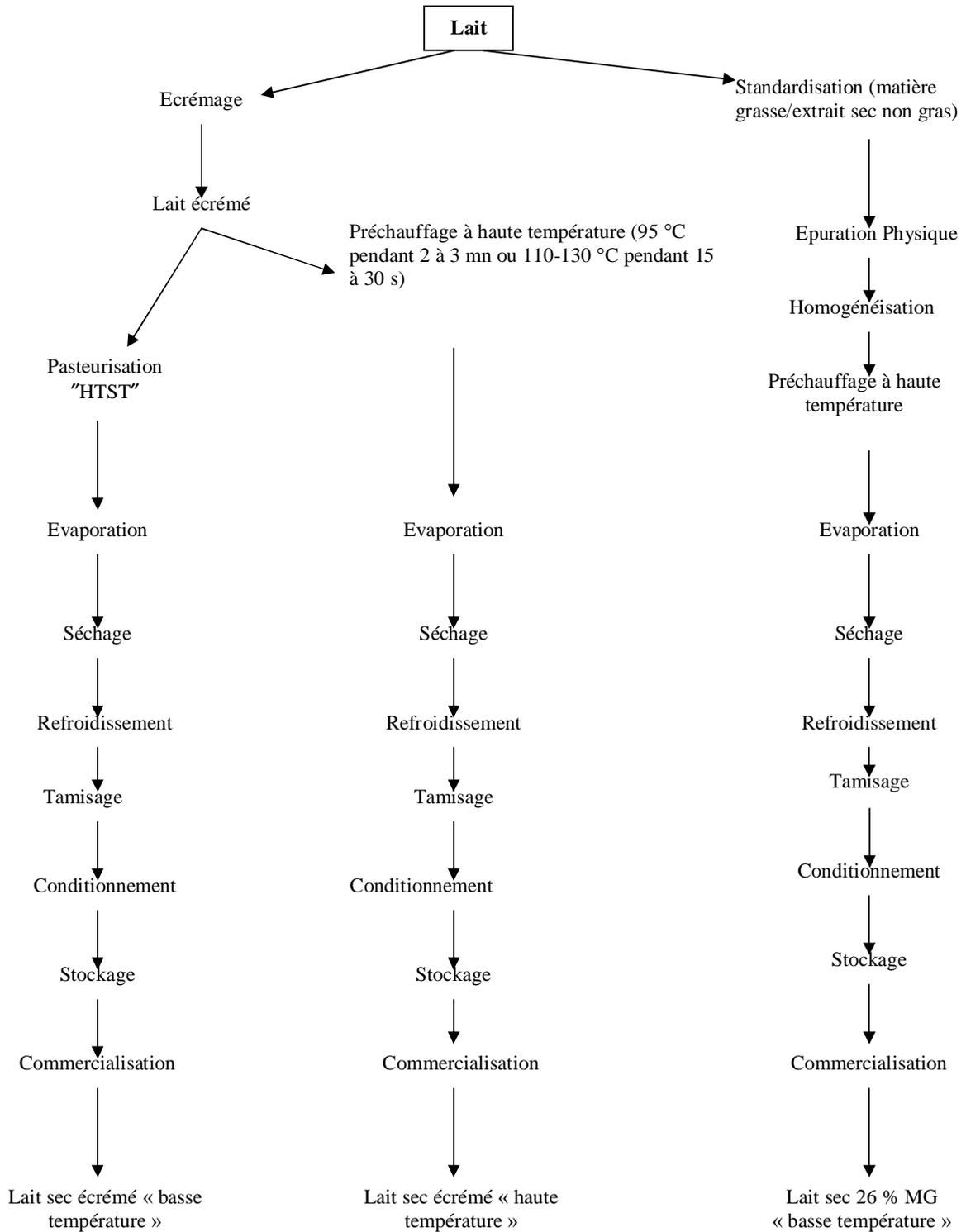


Figure 15 : Diagramme de fabrication du lait sec par le procédé «spray» selon VEISSEYRE (1979).

"HTST" : "High temperature, short time".

Néanmoins, nous relevons une différence sensible concernant la teneur en protéines entre les deux types de laits utilisés (30 g/l pour le lait cru collecté localement contre 39,5 g/l pour le lait mixte). Ces tendances confirment, par ailleurs, les résultats déjà obtenus précédemment au laboratoire (LABAB) en ayant recours à un échantillonnage sur une autre période de l'année (ABERKANE, 1997 ; IABADENE, 2000).

Tableau VIII : caractéristiques physico-chimiques du lait utilisé à la Laiterie de Draa-Ben-Khedda pour la fabrication du *Camembert*.

(Les résultats obtenus représentent la moyenne de 3 essais)

Paramètres	Lait cru	Lait mixte	Normes FIL-AFNOR
pH	6,66	6,65	6 ,6
Acidité (°D)	17	22,83	16 – 18
Matière grasse (g/l)	33	34,5	34 – 36
Densité	1, 030	1, 032	1, 032 – 1, 035
E.S.T (g/l)	110,07	148	102 – 125
E.S.D (g/l)	77,70	113,5	87,5 – 89,9
Protéines (g/l)	30	39,5	34 – 36
Lactose (g/l)	46,5	50,6	47 – 52
Chlorures (g/l)	1,63	1,52	1,5 – 1,8
Humidité %	88,93	85,20	87,5-89,8

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

Dans ce cadre, il est intéressant de noter que l'incorporation de 50 % de lait recombinaison à ce lait permet de corriger cette teneur et par la même augmenter considérablement sa valeur nutritionnelle. Selon STORRY *et al* (1983) et REMEUF (1994), les aptitudes technologiques inhérentes à ce lait seraient aussi améliorées car la faible teneur en protéines est préjudiciable à la coagulation et à l'obtention d'un caillé de fermeté souhaitée.

Pour le cas de la matière grasse, nous constatons une très légère différence (33 g/l pour le lait cru et 34,5 g/l pour le lait mixte). Ceci peut être dû aux mêmes raisons citées précédemment.

3.1.5. Effet du traitement de pasteurisation sur les protéines du lait :

3.1.5.1 Comportement électrophorétique des protéines sériques:

Les profils des protéines du sérum (figure 16) présentent des différences assez notables selon qu'elles proviennent d'un lait ayant subi le traitement de pasteurisation à 85°C pendant 20 sec (lait A) ou celui qui n'a pas été traité (lait B). En effet, il apparaît très clairement que les protéines issues du lait reconstitué à 100% sont pratiquement dénaturées et ont perdu entièrement leurs propriétés de focalisation (piste A2). Ces protéines sont aussi dans un état de détérioration élevé (piste B2) qui serait dû au traitement subi par le lait pour la préparation de la poudre ou la mauvaise conservation de celle-ci avant sa reconstitution.

Concernant le lait frais collecté localement, nous constatons aussi qu'après pasteurisation, il se forme des polypeptides. Ces derniers sont issus probablement d'hydrolyse et migrent aux cotés des protéines caractéristiques du lait bovin à savoir : l' α -lactalbumine (α -La), la β -lactoglobuline (β -Lg), l'albumine sérique bovine (BSA) et les immunoglobulines (Ig). Néanmoins, le traitement appliqué sur ce lait ne paraît pas affecter les entités protéiques les plus sensibles.

Les mélanges opérés (lait cru et lait reconstitué) présentent des profils électrophorétiques où les protéines majeures du sérum semblent aussi être affectées par le traitement thermique utilisé (pistes A3 et A4) mais beaucoup plus faiblement que dans le cas du lait reconstitué seul.

Les résultats de ces essais sont en accord avec les conclusions de MANJI et KAKUDA (1988) ainsi que DONOVAN et MUHIVILL (1987). En effet, l' α -La et secondairement la β -Lg sont les protéines sériques qui résistent le mieux au traitement thermique et l'Ig étant celle qui est la plus sensible.

3.1.5.2. Détermination du pourcentage de dénaturation :

Le dosage des protéines solubles à pH 4,6 et la détermination du pourcentage de dénaturation confirme ces comportements (figure 17). En effet, pour les laits ayant subi la pasteurisation, le pourcentage de protéines dénaturées est en moyenne de 30-35% pour les échantillons issus du lait reconstitué et 8-10% pour ceux issus du lait cru.

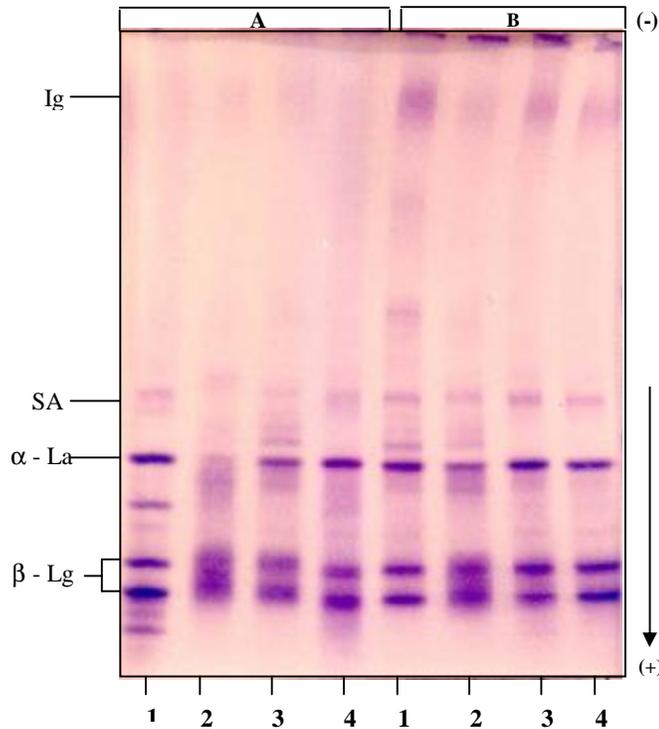


Figure 16 : Profils électrophorétiques des protéines du sérum sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant et non dénaturant (PAGE native), pH 8,9
 A : lait ayant subi un traitement thermique de 85°C pendant 20 sec ; B : lait non traité
 1 : 100% de lait cru, 2 : 100% de lait reconstitué, 3 : (75% de lait reconstitué et 25% de lait cru) et 4 : (50% de lait reconstitué et 50% de lait cru) ; Ig : Immunoglobulines, α-La : α-lactalbumine, SA : l'albumine sérique, β-Lg : β-lactoglobuline.

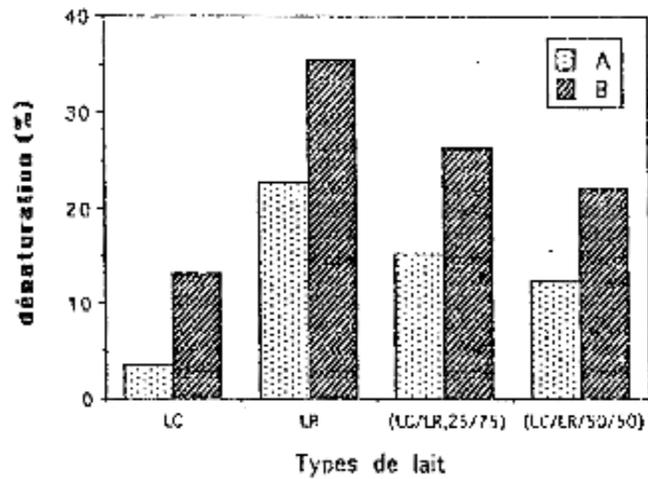


Figure 17 : Dénaturation thermique des protéines sériques (%).
 A : lait avant pasteurisation à 85°C pendant 20 sec
 B : Lait après pasteurisation.
 LC : 100% de lait cru collecté localement
 LR : 100% de lait reconstitué
 (LC/LR, 25/75) : mélange de 25% de lait cru et 75% de lait reconstitué
 (LC/LR, 50/50) : mélange de 50% de lait cru et 50% de lait reconstitué

Cette analyse quantitative met en relief l'étendue des effets néfastes qu'un traitement thermique peut engendrer sur la valeur nutritionnelle et les aptitudes technologiques du lait de départ.

En effet, si sur le plan de l'objectif sanitaire, le traitement pratiqué à l'unité est efficace puisqu'il permet de réduire la charge microbienne du lait d'un facteur de 100 et d'éliminer les germes dangereux susceptibles de s'y retrouver (résultats non rapportés), il n'en demeure pas moins que son impact physico-chimique et nutritionnel sont d'une autre nature.

Le barème (température / temps de chauffage) choisi au niveau de l'unité n'est pas critiquable en soi au niveau théorique puisqu'il correspond aux limites autorisées pour un traitement de type "HTST" qui est conçu pour présenter le moins de préjudices possibles par rapport aux traitements classiques de pasteurisation basse (63°C /20 mn). Néanmoins, sa réalisation pratique pose des problèmes dans le sens où généralement, soit c'est le temps de contact du lait avec l'eau chaude (dans les pasteurisateurs à plaques utilisés) ou c'est la température maximale à atteindre qui sont souvent supérieurs à ce qui est souhaité. Ce qui est de nature à induire de multiples nuisances dont le taux de dénaturation des protéines est l'un des effets les plus manifestes.

ADRIAN et FRANGNE (1991), soulignent que les traitements thermiques excessifs induisent des modifications de la structure des protéines par suite de la destruction des liaisons de faible énergie qui sont responsables des structures secondaire et quaternaire, de la modification du nombre de ponts disulfures ainsi que la formation de nouvelles réticulations qui renforcent la cohésion des entités protéiques. Ces transformations entraînent une perte des conformations spatiales des protéines qui se répercutent par voie de conséquence sur leurs propriétés physico-chimiques (PIERRE *et al*, 1977) et fonctionnelles (DE WIT et HONTELEZ- BACKX, 1981).

D'après VALDICELLI *et al* (1986) ; DONOVAN et MULHIVILL (1987), se sont les protéines sériques du lait qui sont les plus sensibles quand le lait est chauffé à une température supérieure à 70°C. La valeur nutritionnelle de ces protéines, riches en acides aminés essentiels, se trouve affectée car la lysine devient indisponible par suite de sa condensation dans les réactions de Maillard. Les effets néfastes sur les autres nutriments, notamment les vitamines et les éléments minéraux, ont aussi été rapportés (PIERRE *et al*, 1970 ; GLAESER, 1992).

Selon OLDFIELD *et al* (1988), aux températures modérées (inférieures à 100°C), correspondant à celles atteintes au cours de la pasteurisation, on observe surtout une

dénaturation de la β -Lg. Apartir de 80°C, la protéine en solution se polymérise pour former un gel. En effet le groupement thiol libre initialement enfoui au centre de la molécule est démasqué lors du déplissement de la structure globulaire et peut réagir avec d'autres groupements thiols ou avec d'autres ponts disulfure, par échanges intra ou intermoléculaire (CHEFTEL *et al*, 1985).

Sur des échantillons de lait chauffés entre 70 et 100°C et analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, BIKKER *et al*, (2000) ont montré que le taux de dénaturation est différent selon les variants de la β -Lg. En effet, le variant B est le plus sensible à l'action de la chaleur que le variant A alors que le variant C est le plus thermostable.

Dans le lait, des échanges intermoléculaires sont également possible avec d'autres protéines possédant des résidus cystéinyles (κ -CN ; α_{s2} -CN et α -La). Il se forme ainsi des complexes entre les protéines solubles dénaturées et les constituants soufrés de la micelle.

Cependant KELLY (1999) a montré en comparant la protéolyse d'un fromage fabriqué à base d'un lait pasteurisé et celle d'un fromage à base d'un lait cru, que l'hydrolyse de la β -CN est retardée. Ce même auteur confirme que la dénaturation induite par la chaleur des protéines sériques diminue la susceptibilité de la caséine du lait à la dégradation par la plasmine. D'après ENRIGHT *et al* (1999), ceci peut être dû aux complexes formés par les protéines sériques dénaturées notamment la β -Lg avec la surface micellaire.

Par ailleurs, HILLIER et LYSTER, (1979) notent qu'à la suite d'un chauffage à une température supérieure à 70°C, la teneur du lait en protéines solubles à pH 4,6 est inférieure à celle du lait cru.

La diminution de la teneur en protéines solubles à ce pH peut avoir comme causes plusieurs causes :

- formation d'agrégats par polymérisation d'une protéine (cas de la β -Lg) ;
- formation d'agrégats entre les protéines du sérum (cas de α -La et β -Lg) ;
- interaction entre les protéines du sérum et les caséines, par liaisons hydrophobes, et surtout par l'intermédiaire des résidus thiols.

En fromagerie, les effets d'un traitement thermique inapproprié se traduisent par :

- la formation d'un complexe protéique entre la caséine κ et la β -Lg, ce qui constitue un facteur limitant du processus de coagulation enzymatique (SMITH et Mc MAHON, 1996) ;

- la diminution de la concentration en calcium soluble qui rend difficile la création des liaisons entre les micelles lors de la formation et le durcissement du gel. Ces manifestations conduisent à une augmentation des temps de prise, à une diminution de la fermeté du gel et enfin à un ralentissement de l'opération d'égouttage (MAUBOIS et BRULE, 1984).

Globalement, nous pouvons conclure que le traitement thermique appliqué souvent de façon excessive dans certaines unités est préjudiciable à plus d'un titre pour la qualité des produits (perte protéique, diminution de la valeur nutritionnelle, perte des propriétés techno-fonctionnelles, altération des caractéristiques organoleptiques...etc). A titre indicatif, la figure 18 récapitule les différentes répercussions engendrées par un traitement thermique intense sur le lait.

Concernant l'amélioration de la stabilité thermique du lait, il est préconisé de relever le pH de ce dernier (à environ 7) avant le traitement ou de l'enrichir en concentrés de protéose-peptones. Ces dernières sont des fractions protéiques du lait très thermostables (résistent à un traitement de 95°C/ 30 min) et possèdent un effet protecteur sur les protéines sensibles du lait (GIRARDET *et al*, 1992 ; MATI *et al*, 1993).

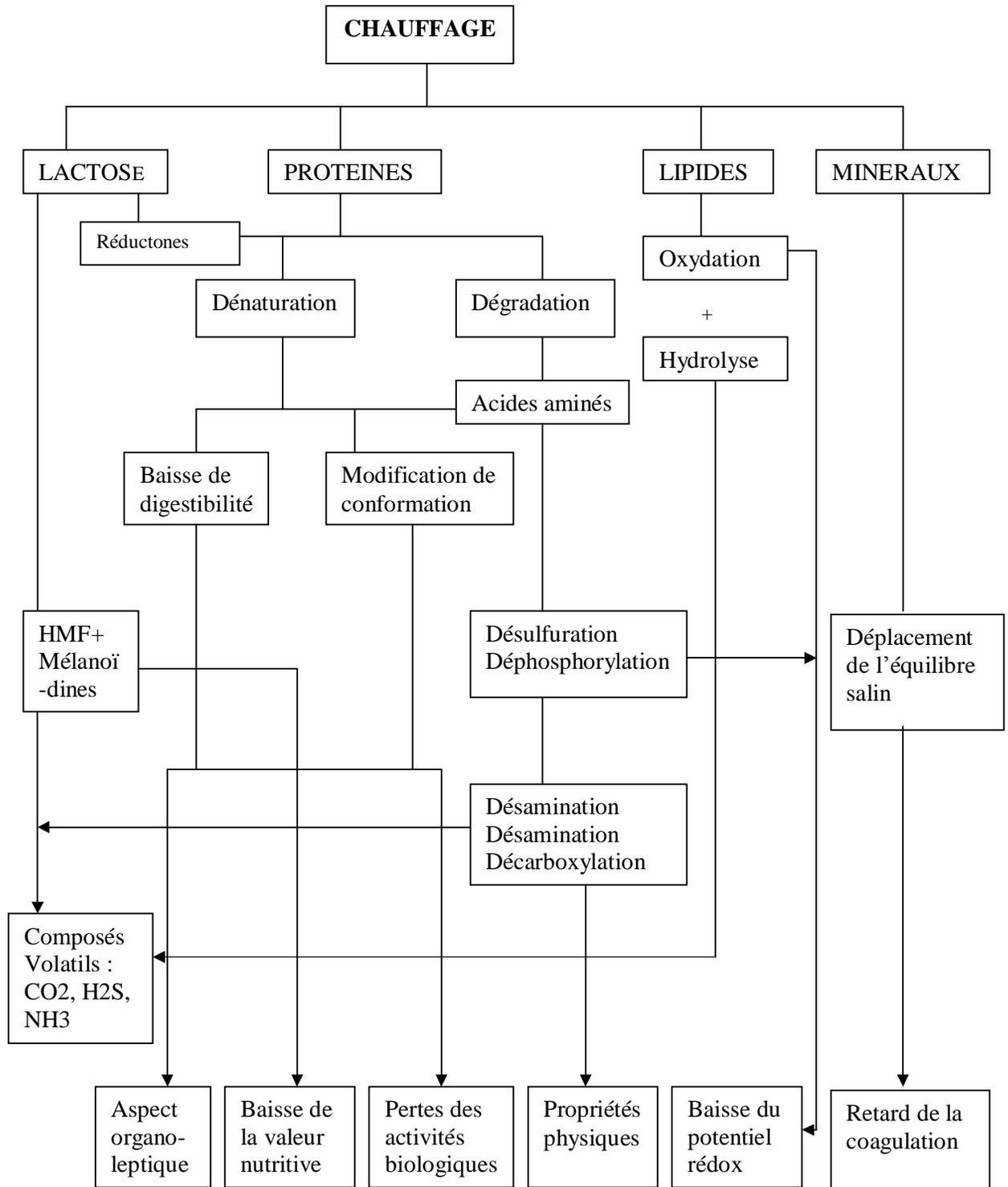


Figure 18 : Effet du chauffage sur les propriétés physiques, chimiques, nutritionnelles et organoleptiques des constituants du lait (d’après HUMBERT, 1976).

3.2. Résultats de l'évolution et de l'appréciation du *Camembert* au cours de la phase d'affinage et de l'entreposage réfrigéré :

3.2.1. Analyses physico-chimiques :

Concernant les paramètres physico-chimiques mesurés au cours de l'affinage des fromages (tableaux IX et X), nous constatons que des taux similaires concernant le pH, le taux de protéines, le taux de matière grasse et les chlorures ont été enregistrés aux différents stades de maturation dans les deux types de fromage (FLL, FLM) :

- fromage fabriqué à partir du lait cru collecté localement (FLL) ;
- fromage fabriqué à partir du lait mixte ou mélange à part égales entre le lait cru et le lait recombinaison (FLM).

Pour le pH, il y a une légère diminution en début d'affinage jusqu'au stade (j+6) et ce dans les deux parties (superficielle et interne) des deux types de fromage. Ceci est en accord avec les travaux de BOUTROU *et al* (1999). Ce phénomène s'explique par la poursuite de la fermentation du lactose résiduel du caillé par les bactéries lactiques.

Après le sixième jour d'affinage, il y a une désacidification progressive de la croûte qui permet d'atteindre après 20 jours des valeurs de pH équivalentes à 6,64 et 7,10, respectivement pour FLL et FLM.

Cette neutralisation de la pâte, due au développement des levures et notamment des moisissures (FOX, 1989), contribue à une modification de la texture qui perd son aspect granuleux. Elle induit également une activité maximale de la plupart des enzymes protéolytiques et lipolytiques. A l'opposé, le pH reste acide au niveau interne (pour les deux types de fromage), confirmant l'action enzymatique accrue de la flore superficielle sur l'élévation du pH.

Notons que LEGRAET *et* BRULE (1988), travaillant sur un fromage affiné jusqu'à 20 jours ont obtenu des valeurs de pH de 7,0 ; 6,5 et 4,8 respectivement pour la croûte, la sous-croûte et la partie centrale du fromage.

Concernant l'extrait sec total, nous remarquons une concentration progressive de la pâte fromagère, légèrement plus intense dans le cas du fromage élaboré à partir du lait mixte (FLM). Ceci pourrait être expliqué, selon HASSOUNA *et al* (1996), par les échanges de produits volatils (eau, ammoniac, acides gras...) entre le fromage et son environnement.

La variation de la teneur protéique et celle de la matière grasse sont relativement faibles tout au long du processus d'affinage. Toutefois, le rapport (gras/sec), dans le cas du FLM, est sensiblement inférieur au taux minimum requis pour le *Camembert* qui est de

Tableau IX: Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'affinage du *Camembert* issu du lait cru collecté localement (FLL).

Paramètres	Stades d'affinage en jours									
	Partie superficielle (croûte)					Partie interne (masse)				
	J=0	J+6	J+12	J+15	J+20	J=0	J+6	J+12	J+15	J+20
pH	4,86	4,74	5,87	6,77	6,64	4,86	4,62	4,98	5,12	4,93
Humidité (%)	57,28	51,72	54,98	51,10	50,47	57,28	54,28	52,46	55,70	53,00
E.S.T (g/100g)	42,72	48,28	45,02	48,90	49,53	42,72	45,77	47,46	44,30	47,00
E.S.D (g/100g)	22,20	26,78	28,52	27,40	28,53	22,20	25,77	25,54	21,30	25,75
M.G (g/100g)	20,50	21,50	16,50	21,50	21,00	20,50	20,00	22,00	23,00	21,25
Gras/sec (%)	47,98	44,00	36,65	43,96	42,39	47,98	43,00	46,27	51,91	45,21
Protéines (g/100g)	15,50	14,00	19,25	16,00	19,25	15,50	16,50	17,75	19,50	16,40
Chlorures (g /100g)	1,95	2,51	2,34	1,55	1,78	1,95	2,60	2,04	1,90	2,39

Tableau X : Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'affinage du *Camembert* issu du lait mixte (FLM).

Paramètres	Stades d'affinage en jours									
	Partie superficielle (croûte)					Partie interne (masse)				
	J=0	J+6	J+12	J+15	J+20	J=0	J+6	J+12	J+15	J+20
pH	4,95	4,86	6,01	6,56	7,10	4,95	4,74	5,16	4,94	4,90
Humidité (%)	58,91	53,90	52,54	49,30	47,14	58,91	53,92	57,36	54,90	54,20
E.S.T (g/100g)	41,09	46,10	47,46	50,70	52,86	41,09	46,08	42,64	45,10	45,80
E.S.D (g/100g)	23,59	26,10	29,46	34,70	34,61	23,59	27,58	23,14	27,10	27,05
M.G (g/100g)	17,50	20,00	18,00	16,00	18,25	17,50	18,50	19,50	18,00	18,75
Gras/sec (%)	42,58	43,00	37,92	31,55	34,52	42,58	40,14	47,73	39,91	40,93
Protéines g/100g)	18,00	18,00	19,25	16,20	19,60	18,00	18,75	19,50	19,75	19,25
Chlorures (g/100g)	2,17	2,34	2,34	1,97	1,40	2,17	1,60	2,04	1,75	2,45

40%. Ceci s'explique également par l'accroissement accru de l'extrait sec à la croûte du *Camembert*.

Enfin, concernant les teneurs en chlorures, les travaux antérieurs ont montré que dès le début de l'affinage, il y a une migration rapide du sel de la croûte vers le cœur de la pâte suivant un gradient de concentration, ce qui a pour conséquence une diminution du taux de chlorures en surface.

Toutefois, les résultats obtenus quant à ce paramètre n'illustrent pas cette tendance.

Le suivi de l'affinage des fromages entreposés dans une enceinte réfrigérée à (6 - 10°C), nous a permis de noter (tableaux XI et XII), certaines différences dans l'évolution de l'extrait sec total et l'humidité. Ces facteurs présentent néanmoins une stabilité relative qui pourrait s'expliquer par des échanges négligeables avec l'ambiance humide du réfrigérateur.

En revanche, la désacidification superficielle de la pâte fromagère persiste même au froid dans les deux types de fromages, quoiqu'à un niveau relativement moindre (pH = 6,31 pour FLL et 6,53 pour FLM au $J_{er} + 7$).

3.2.2. Analyses microbiologiques :

Les résultats du dénombrement des grands groupes microbiens (figure 19) montrent que globalement il n'y a pas de différences sensibles dans l'évolution de ces populations pour le cas des deux types de fromages fabriqués (FLL, FLM) et ce durant les stades d'affinage suivis.

La flore totale suit une évolution similaire dans les fromages fabriqués, indépendamment de l'origine du lait et ce avec une charge légèrement supérieure en surface. Ceci pourrait s'expliquer, selon HASSOUNA *et al* (1996), par le fait que la désacidification de la pâte après le développement du *Penicillium* permet l'implantation de la flore acido-sensible et halotolérante en surface.

Concernant la flore lactique, nous notons une quantité relativement abondante des streptocoques et des lactobacilles, aussi bien à l'intérieur que sur la croûte du fromage.

Dans les premiers jours d'affinage, ce taux qui était relativement bas, a connu une augmentation progressive à partir du stade (J+6) en surface du *Camembert* et du stade (J+12) en profondeur.

Tableau XI : Evolution des paramètres physico-chimiques du *Camembert* fabriqué à partir du lait cru (FLL), au cours de l'entreposage dans une enceinte réfrigérée à (6 - 10°C).

Paramètres	Stades d'entreposage en jours							
	Partie superficielle (croûte)				Partie interne (masse)			
	J _{er} =0	J _{er} +2	J _{er} +4	J _{er} +7	J _{er} =0	J _{er} +2	J _{er} +4	J _{er} +7
pH	5,87	5,64	5,82	6,31	4,98	4,50	4,48	4,95
Humidité (%)	54,98	54,00	54,27	55,00	52,46	54,40	59,00	57,00
E.S.T (g/100g)	45,02	46,00	45,73	45,00	47,46	45,60	41,00	43,00
E.S.D (g/100g)	28,52	26,00	24,73	23,00	25,54	24,10	19,50	22,00
M.G (g/100g)	16,50	20,00	21,00	22,00	22,00	21,50	21,50	21,00
Gras/sec (%)	36,65	43,34	45,00	48,00	46,27	47,14	52,00	48,00
Protéines (g/100g)	19,25	17,00	18,25	18,75	17,75	18,00	19,00	19,75
Chlorures (g/100g)	2,34	1,69	1,58	1,69	2,04	1,84	1,63	1,72

Tableau XII : Evolution des paramètres physico-chimiques du *Camembert* fabriqué à partir du lait mixte (FLM) au cours de l'entreposage dans une enceinte réfrigérée à (6-10°C).

Paramètres	Stades d'entreposage en jours							
	Partie superficielle (croûte)				Partie interne (masse)			
	J _{er} =0	J _{er} +2	J _{er} +4	J _{er} +7	J _{er} =0	J _{er} +2	J _{er} +4	J _{er} +7
pH	6,01	5,41	5,89	6,53	5,16	4,59	4,60	4,82
Humidité (%)	52,54	68,10	56,80	57,00	57,36	58,10	59,20	59,00
E.S.T (g/100g)	47,46	31,90	43,20	43,00	42,64	41,90	40,80	41,00
E.S.D (g/100g)	29,46	16,90	27,20	26,00	23,14	24,90	24,30	24,50
M.G (g/100g)	18,00	15,00	16,00	17,00	19,50	17,00	16,50	16,50
Gras/sec (%)	37,92	47,02	37,00	39,00	47,73	40,57	40,00	40,00
Protéines (g/100g)	19,25	18,25	19,00	19,25	19,50	19,00	18,50	19,75
Chlorures (g/100g)	2,34	2,22	1,60	2,01	2,04	2,19	1,90	2,16

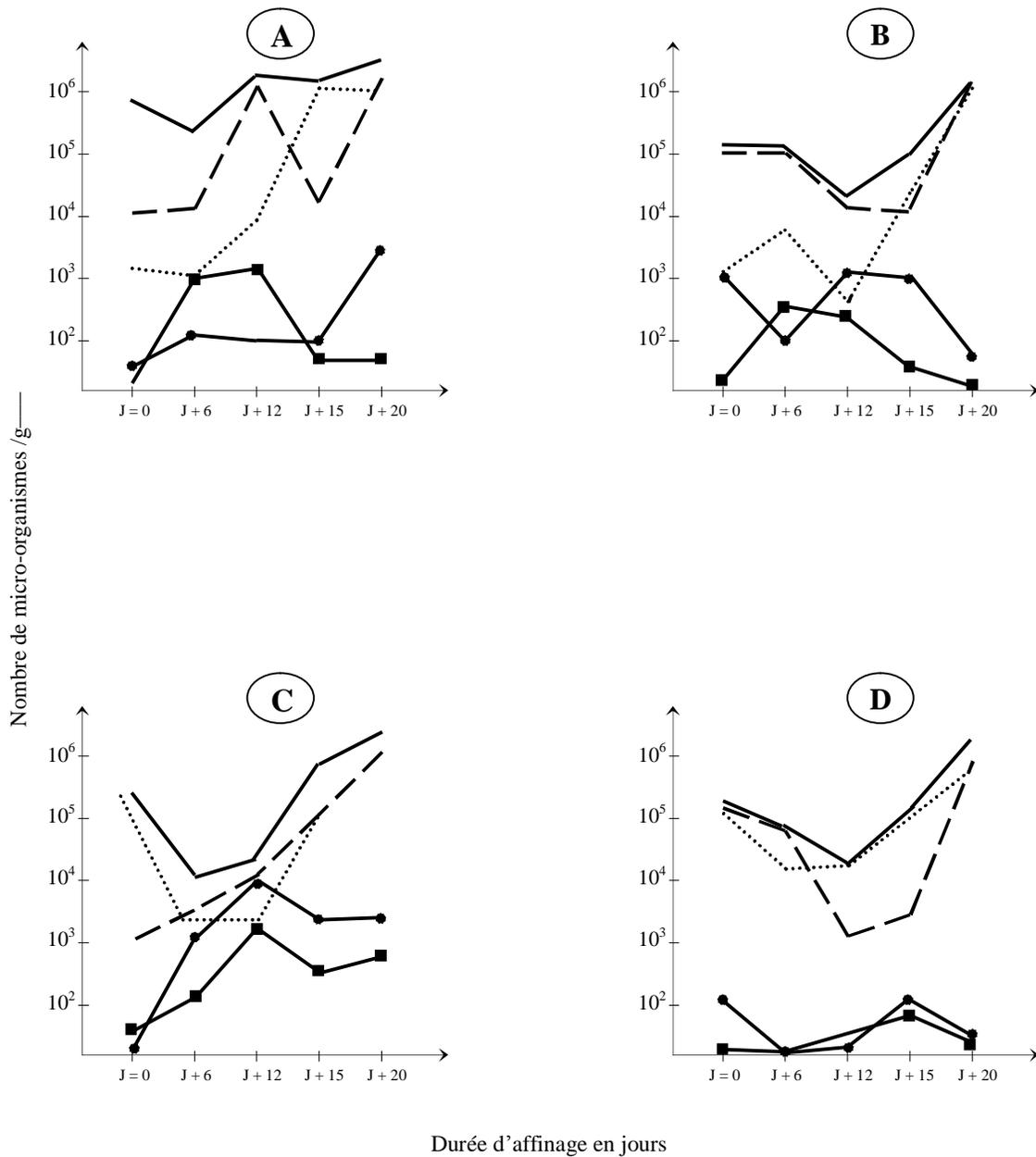


Figure 19: Evolution de la flore microbienne dès l'admission au hâloir jusqu'à 20 jours d'affinage du Camembert fabriqué à la laiterie de DBK.

A : Surface, B : Intérieur du Camembert issu du lait cru local (FLL).

C : Surface, D : intérieur du Camembert issu du lait mixte (FLM).

(—) Germes totaux , (◆) Flore halo tolérante , (●) Levures et moisissures , (—) Streptocoques lactiques , (.....) Lactobacilles).

Cette évolution s'explique par le fait que l'acidité du caillé à l'admission au hâloir freine la croissance des bactéries lactiques au profit d'une flore acidotrophe constituée de levures et notamment du *Geotrichum*. Après la neutralisation de la pâte en surface, sous l'action de *Penicillium*, la flore lactique prend une allure croissante et une orientation centripète. Parallèlement à la désacidification superficielle, il y a une diffusion de l'acide lactique du centre vers la croûte du fromage (LECLERCQ-PERLOT *et al*, 2000) qui va réduire l'acidité et permettre une croissance accentuée de la flore lactique aux stades avancés d'affinage.

Le développement des levures et des moisissures s'effectue de façon intense dans les premiers jours d'affinage, particulièrement sur la croûte, puis diminue assez sensiblement par la suite pour se situer à des limites faibles après 20 jours de maturation. Ceci est nettement mis en relief dans le cas du fromage à base du lait mixte. Cette évolution serait due à la dégradation du lactose par les levures au cours de l'égouttage et pendant les premiers jours de maturation. Ce qui stimule ainsi leur croissance.

A partir du sixième jour d'affinage, *Penicillium* va, en se développant (par consommation d'acide lactique), provoquer la remontée du pH. Celle-ci favorisera à son tour la multiplication de la flore acido-sensible (microcoques, coynébactéries...) qui va concurrencer et réduire progressivement l'impact de la flore fongique, d'où l'abaissement de sa teneur en fin d'affinage.

La flore halotolérante, constituée essentiellement de microcoques et de bactéries corynéformes, s'installe suite à la désacidification superficielle et progressive de la pâte. L'importance de ce type de micro-organismes est mis en évidence dans des phénomènes biochimiques variés (CHOISY *et al*, 1987), notamment leur contribution dans la formation d'arômes. Leur taux initial, qui est plus élevé en surface qu'en profondeur du fromage, tend à se réduire en fin d'affinage. Un tel constat pourrait être attribué au phénomène de concurrence générée par la croissance abondante de la flore lactique (LENOIR *et al*, 1983). Il est à signaler que la recherche des coliformes n'a pas révélé de contaminations particulières des fromages fabriqués car les taux obtenus à chaque fois sont très faibles et se situent dans des limites requises pour l'appréciation de la bonne qualité de ces produits.

L'étude comparative de l'effet de l'entreposage des *Camemberts* affinés (pendant 12 jours) à basse température et celui relatif au prolongement du temps d'affinage dans les hâloirs, a montré (figure 20) qu'il y a une analogie dans l'allure du développement de la plupart des germes recherchés.

En effet, à l'exception de quelques légères différences, les germes totaux ainsi que la flore halotolérante présentent une évolution similaire dans les deux conditions étudiées. Pour les bactéries lactiques, les streptocoques et les lactobacilles, ils constituent dans ce cas également la flore dominante. Ces germes continuent de s'accroître abondamment même après le septième jour de conservation à une température de réfrigération. Cependant, une différence est à noter. Elle concerne l'évolution de la flore fongique pour laquelle nous avons enregistré des taux plus élevés dans les *Camemberts* conservés à basse température. Ceci pourrait s'expliquer par leur stimulation, suite au niveau élevé d'humidité qui règne dans l'enceinte de réfrigération.

3.2.3. Evaluation de l'activité protéolytique :

3.2.3.1. Le dosage des groupements aminés libres:

Etant bien corrélée aux méthodes classiques de suivi de la protéolyse dans le fromage (KUCHROO *et al*, 1983), la procédure au TNBS permet d'évaluer, de façon plus fiable, l'état de dégradation des caséines dans les *Camemberts* testés selon le temps d'affinage considéré. En effet, chaque liaison peptidique hydrolysée, sous l'action d'enzymes protéolytiques, libère un radical NH₂ libre qui réagit avec cet acide.

Au niveau de l'affinage du *Camembert*, les travaux ont montré que la protéolyse est déclenchée initialement par l'enzyme coagulante : la présure (DESMAZEAUD *et SPINLER*, 1997), puis elle est poursuivie par l'action de la plasmine, notamment sur la caséine β . Ces deux enzymes sont surtout impliquées dans la dégradation primaire des protéines du fromage où les caséines sont scindées en gros peptides (GRAPPIN *et al*, 1985 ; BERTRAND, 1988). Ces derniers, seront repris par le complexe enzymatique microbien donnant naissance à des peptides courts et acides aminés libres.

Selon GRIPON *et al* (1976), la libération des peptides par la présure seule est suffisamment importante pour atteindre, en fin d'affinage, des valeurs d'azote soluble de l'ordre de 32% de l'azote total du *Camembert*.

Les résultats obtenus (figure 21) montrent une évolution progressive des groupements aminés au fur et à mesure que le stade d'affinage augmente. En outre, il est à relever que ces groupements se trouvent à des taux plus élevés au niveau de la croûte, particulièrement des fromages fabriqués à partir du lait mixte.

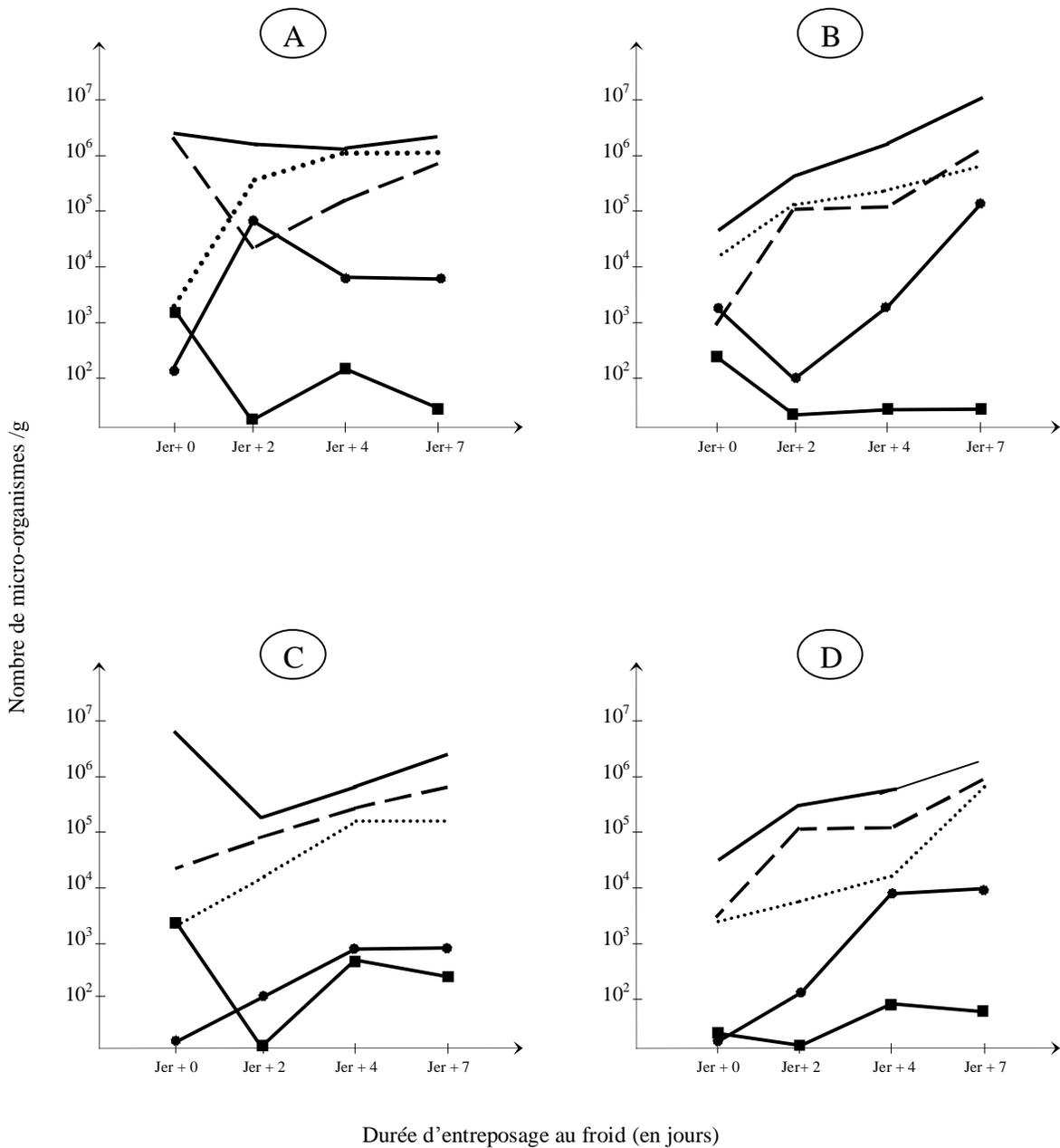


Figure 20 : Evolution de la flore microbienne se développant au niveau du Camembert affiné à 12 jours lors de son entreposage à 6-10°C pendant une semaine.

A : Surface ; B : Intérieur du Camembert issu du lait local (FLL).

C : Surface ; D : intérieur du Camembert issu du lait mixte (FLM).

(—) Germs totaux , (◆) Flore halo tolérante , (●) Levures et moisissures , (—) Streptocoques lactiques , (.....) Lactobacilles).

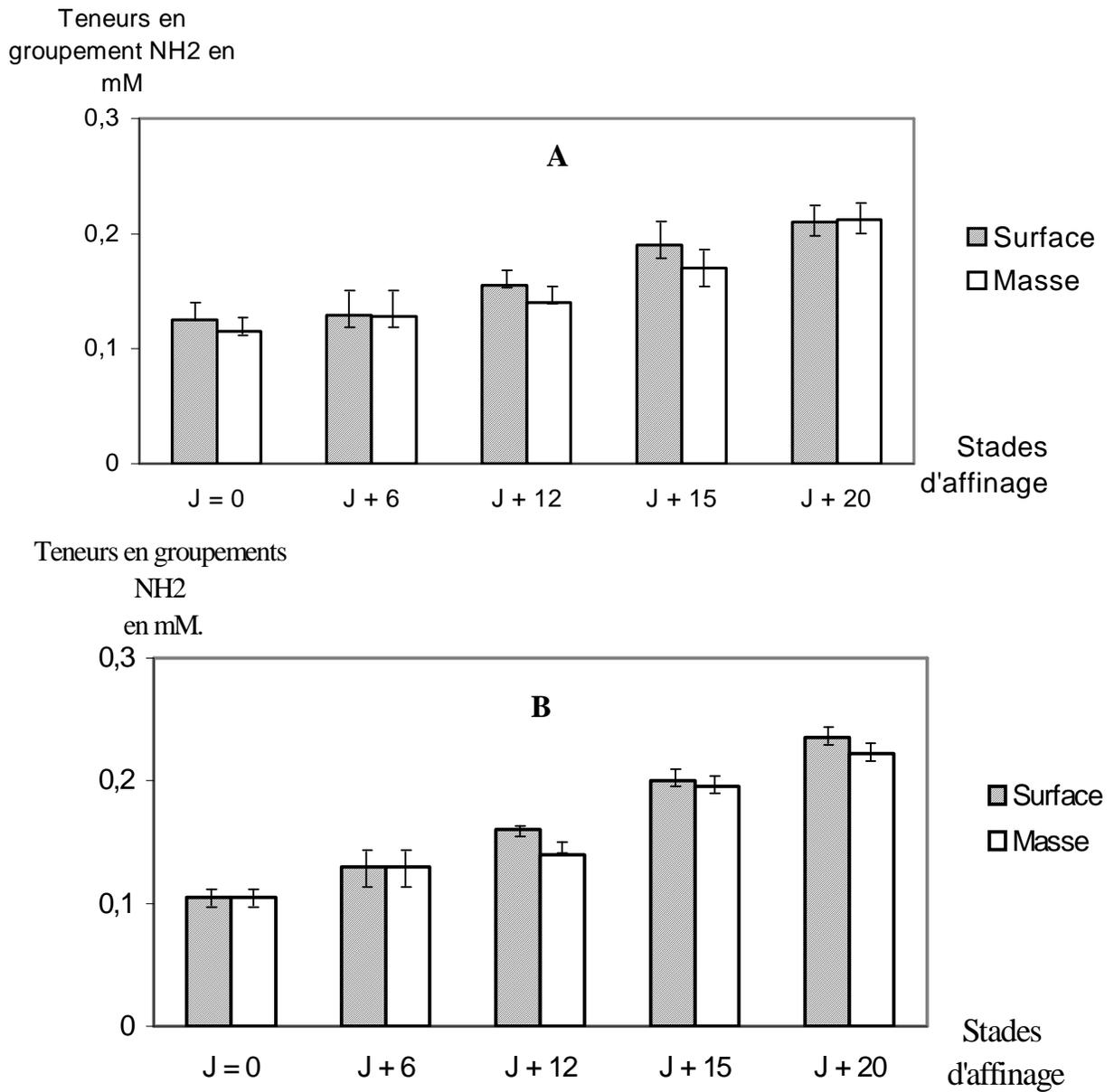


Figure 21 : Evolution de la teneur en groupements NH2 libres durant l'affinage du Camembert fabriqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda.

A : Fromage issu du lait cru local (FLL) ;

B : Fromage issu du lait mixte (FLM).

De même, il est possible de noter que c'est vers le sixième jour d'affinage que des différences assez nettes apparaissent entre les deux parties du même fromage. Ces niveaux de protéolyse différents entre la superficie et la masse interne du *Camembert* sont le résultat de la neutralisation progressive du pH par *Penicillium* qui induit une activité accrue des enzymes protéolytiques.

La protéolyse continue à se faire même si le fromage est conservé à la température de réfrigération (6 - 10°C) (figure 22). Dans ce cas, c'est le lait cru qui manifeste les plus forts taux. Mais il est intéressant de constater que le nombre des groupements NH₂ enregistrés après une semaine d'entreposage (à 6-10°C) dépasse sensiblement celui ayant été relevé après 20 jours d'affinage dans les hâloirs. Cette évolution serait due à la prolifération des levures et moisissures dans l'enceinte réfrigérée. En effet, la contribution de cette flore à la protéolyse a été souligné par plusieurs auteurs (LENOIR *et al*, 1983 ; CHOISY *et al*, 1997).

Notons que la méthode au TNBS a été utilisée par POLYCHRONIADOU (1988) sur des fromages à pâtes dures et par HUMBERT *et al* (1989) sur des pâtes molles type Brie. Ces auteurs ont pu mesurer l'augmentation progressive de la teneur en groupements aminés libres au cours de l'affinage, de ces fromages.

3.2.3.2. Comportement électrophorétique des protéines :

L'évaluation qualitative par le suivi du comportement électrophorétique des principales protéines du fromage (à savoir les caséines) permet de suivre la dégradation enzymatique de ces dernières lors des différents stades d'affinage du fromage et la formation des fragments peptidiques de tailles variables.

L'électrophorèse PAGE-Urée est particulièrement adaptée pour la séparation, à pH 8,6, des protéines non globulaires comme les caséines (PELISSIER, 1984). La sensibilité et le pouvoir de résolution de cette technique lui ont valu d'être considérée comme un outil performant dans l'évaluation de la protéolyse des caséines. Ceci est rendu possible par l'action des agents dissociants utilisés dont le rôle est de rompre les liaisons hydrogènes (cas de l'urée) et les ponts disulfures (cas du β-mercaptoethanol), permettant ainsi aux entités protéiques de migrer sous leur forme la plus simple, en fonction du poids moléculaire et de la charge.

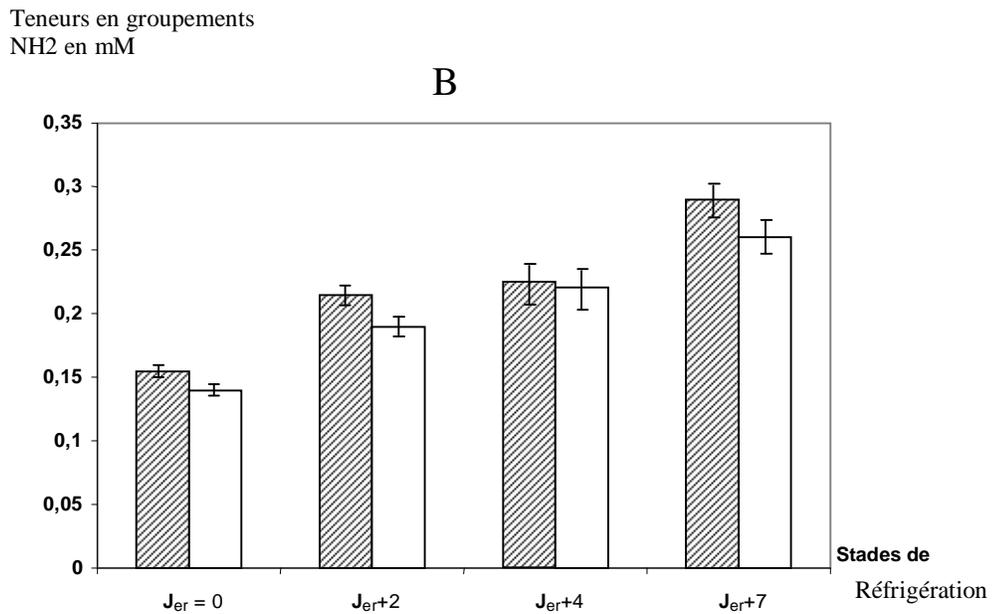
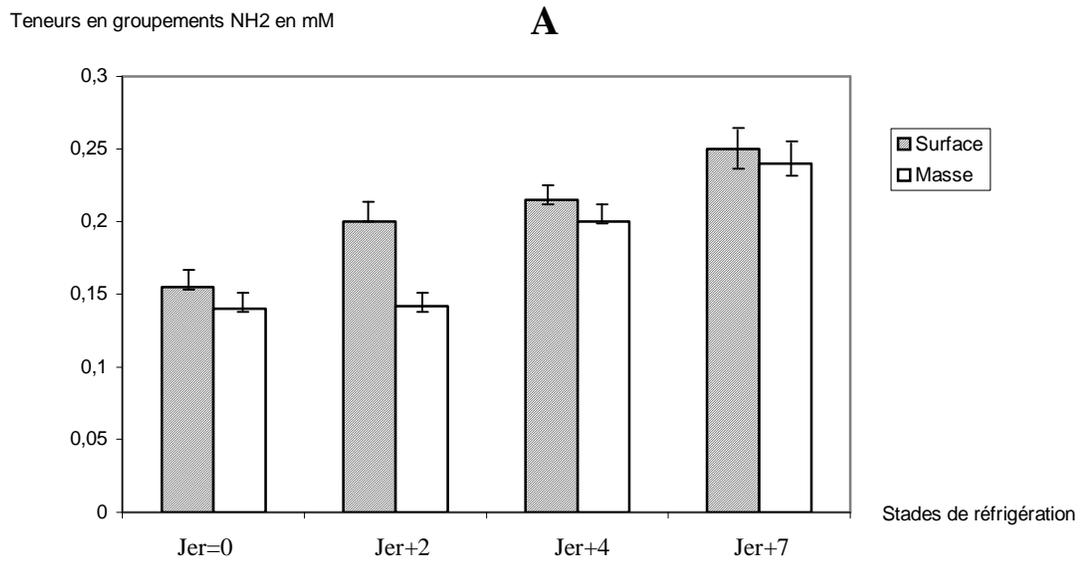


Figure 22 : Evolution de la teneur en groupements NH₂ libres au cours de l'entreposage au froid (6-10°C) du *Camembert* affiné pendant 12 jours.

A : Fromage issu du lait local (FLL) ;
 B : Fromage issu du lait mixte (FLM).

Les références bibliographiques mentionnent que la présure est le premier agent de la protéolyse dans le fromage. Elle attaque préférentiellement la caséine α_{S1} en scindant la liaison (Phe₂₃-Phe₂₄), puis elle hydrolyse la caséine β . Cette dernière est néanmoins plus sensible à l'action de la plasmine qui libère ainsi les caséines δ et les fragments de protéose-peptones correspondants. Après cette hydrolyse primaire qui est à l'origine, en général, de peptides de haut poids moléculaire, c'est le tour des protéases bactériennes et fongiques d'enclencher la protéolyse secondaire (BERTRAND, 1988).

Les profils électrophorétiques obtenus (figures 23, 24, 25 et 26) montrent assez nettement l'évolution des caséines majeures qui migrent dans ces conditions suivant l'ordre croissant de leur mobilité comme suit : $b\text{-CN} < \alpha_{S2}\text{-CN} < \alpha_{S1}\text{-CN}$.

Il est à relever de par ces diagrammes la différence notable qui existe entre la protéolyse ayant lieu au niveau de la croûte et celle se déroulant dans la masse interne du fromage, et ce indépendamment de l'origine du lait qui a servi à la fabrication de ce dernier. Cette différence se matérialise surtout à partir du sixième jour d'affinage.

Il est à signaler que cette évolution est relativement constante car elle va dans le même sens que les tendances enregistrées par les études antérieures menées au laboratoire (LABAB) (ABERKANE, 1997 ; IABADENE, 2000). Dans ces essais, le *Camembert* fabriqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda est évalué en faisant varier la nature du lait de départ (lait cru, lait de mélange à différentes proportions) et la période de fabrication (printemps - été / automne - hiver). GRIPON *et al* (1977) et BOUTROU *et al* (1999) ont rapporté des conclusions similaires en travaillant sur d'autres types de *Camembert*.

En nous basant sur les données bibliographiques, il est possible de procéder à une pré-identification des principaux fragments d'hydrolyse ainsi qu'à l'interprétation des phénomènes observés comme suit :

- à l'entrée au hâloir (stade J=0), il est à remarquer l'apparition d'une bande (fragment A) de mobilité électrophorétique plus forte que la caséine α_{S1} et qui s'intensifie durant l'affinage. Ce fragment correspondrait au peptide dénommé $\alpha_{S1}\text{-I}$, mis en évidence pour la première fois par LEDFORD *et al* (1966) sur le fromage Cheddar avant que HILL *et al* (1974) ainsi que CREAMER *et* RICHARDSON (1974) ne montrent que ce peptide correspond au segment C-terminal (24/25 – 199) de la caséine α_{S1} . Notons que ce fragment a été identifié dans divers fromages (MULVIHILL *et* FOX, 1977 ; MARCOS *et al*, 1979 ; PELISSIER, 1984 ; TAKAFUJI, 1993 ; MAYER *et al*, 1998). Sa présence dans

les premiers stades de l'affinage semble être liée à l'amollissement de la pâte fromagère (CREAMER *et* OLSON, 1982) ;

- d'autres fragments d'hydrolyse sont aussi apparents (notés B, C et D sur le diagramme). La bande B qui apparaît assez précocement (au J=0) et qui s'intensifie à partir de (J+6) pourrait probablement provenir elle aussi de l'action de la présure sur les caséines. En effet, du fait du pH acide, l'activité protéolytique au cours des premiers 6-7 jours d'affinage serait due principalement à l'action de la présure (chymosine et pepsine) retenue dans le caillé à des teneurs variant de 6 - 10% (GRAPPIN *et al*, 1985 ; FOX, 1988 ; DESMAZEAUD *et* SPINNLER, 1997). Par ailleurs, LANE *et al* (1999) ainsi que FEENEY *et al* (2001) ont observé l'apparition d'un composant analogue (à la bande B) sur le fromage type Mozzarella et l'ont identifié comme étant le fragment (102-199) de la caséine α_1 ;

- il y a lieu de relever, à partir du stade (J+6), la diminution de l'intensité des bandes correspondant aux caséines dans les parties superficielles des deux types de fromages étudiés. Ceci s'expliquerait par l'activité protéolytique accrue des enzymes de la flore superficielle ainsi que de la plasmine (BOUTROU *et al*, 1999). Cette activité est stimulée par la remontée du pH au voisinage de la neutralité dans la croûte, suite à l'utilisation de l'acide lactique par les moisissures du genre *Penicillium* (LENOIR *et al*, 1983 ; POLYCHRONIADOU *et* MANOLKIDIS, 1984) ;

- selon certains travaux, la présure, dans l'intervalle de pH (5,8-7,0) cliverait davantage la caséine α_1 (sur d'autres sites que ceux mentionnés plus haut) pour donner naissance aux fragments peptidiques : α_{S1-II} , α_{S1-III} et α_{S1-IV} . Ces derniers ont été observés par MULVIHILL *et* FOX (1977) dans le cas de l'affinage du Cheddar. Le fragment que nous avons dénommé C dans le cas des profils obtenus pourrait correspondre, au vu de son niveau de migration et de son temps d'apparition, à l'un de ces produits d'hydrolyse ;

- la caséine β est moins sujette à l'action de la présure même si de nombreux auteurs dont (VISSER *et* SLANGEN, 1977 ; De JONG *et* De GROOT-MOSTERT, 1977) ont rapporté que cette enzyme pourrait cliver la caséine β au pH 6,5, en trois sites de coupure, entraînant la formation des peptides βI , βII et βIII . Cette action paraît néanmoins moins évidente pour DESMAZEAUD *et* SPINNLER (1997) ;

- selon GRIPON (1985), l'action de la protéase alcaline du lait (ou plasmine), qui s'intensifie en surface du *Camembert* après la formation du feutrage mycelien, contribue

de façon remarquable au processus de maturation du fromage. Ainsi les caséines β et α_{S2} sont rapidement hydrolysées par la plasmine. Cette action libère notamment, à partir de la caséine β les différentes caséines γ et les composants 5 et 8 des protéose-peptones (TRIEU-CUOT *et* GRIPON, 1982 ; LE BARS *et* GRIPON, 1989 ; VISSER *et al*, 1989). Cette enzyme est susceptible aussi de dégrader, mais plus lentement, la caséine α_{S1} (EIGEL, 1977 ; LE BARS *et* GRIPON, 1993) ainsi que les produits issus de l'action de la chymosine (TRUJILLO *et al*, 1998 a ; LANE *et al*, 1999) ;

- l'activité protéolytique dans le cas du *Camembert* est étroitement liée aussi à l'action des enzymes protéolytiques du *Penicillium*, notamment les aspartyl et métalloprotéinases sécrétées par *P. caseicolum*, ainsi que celles produites par les ferments lactiques (TAKAFUJI, 1994 ; CHOISY *et al*, 1997). Les deux protéinases extracellulaires du *P. caseicolum* agiraient préférentiellement sur les caséines α_{S1} et β ;

- l'action des protéinases bactériennes, notamment celles des streptocoques lactiques mésophiles (CERNING *et al*, 1987), est étroitement liée à la phase secondaire de la protéolyse : les peptides libérés par action de la présure, plasmine et protéinases fongiques seront à leur tour hydrolysés en peptides plus courts et en acides aminés, par les peptidases microbiennes formant ainsi des produits responsables du développement de la flaveur du fromage (TRUJILLO *et al*, 1998 b) ;

- les profils électrophorétiques montrent aussi que dans la partie interne des fromages étudiés, les bandes correspondant aux caséines ne sont que peu affectées alors qu'en parallèle, nous pouvons comptabiliser de nombreuses bandes issues de l'activité protéolytique. Ceci résulterait, selon LENOIR (1970), d'une diffusion des peptides produits en surface vers le cœur du produit (migration centripète), ce qui d'ailleurs a été vérifié par BOUTROU *et al* (1999) en menant une étude sur le jus extrait du *Camembert* durant l'affinage, ainsi que par l'étude de MESSENS *et al* (2000) sur un autre type de fromage à pâte molle.

- les deux types de fromages considérés donnent une allure différente au stade (J+20) d'affinage. En effet, dans la masse du fromage fabriqué à base du lait cru collecté localement (FLL), il y a une diminution intense des bandes correspondant aux caséines ainsi que la disparition des bandes correspondant aux produits de première protéolyse. Ce phénomène ne s'observe pas dans la masse du fromage à base du lait mixte. Ceci pourrait être dû à l'élimination d'une plus grande partie de la flore totale de ce dernier, particulièrement lors de la transformation du lait en poudre.

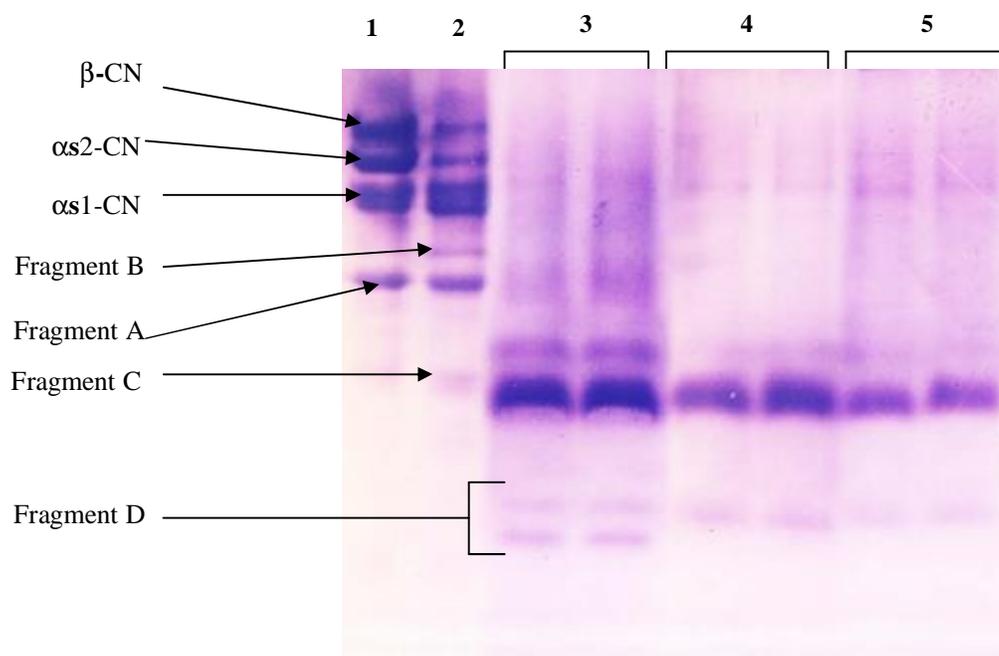


Figure 23 : Comportement électrophorétique en PAGE – Urée des protéines issues de la partie superficielle du *Camembert* fabriqué à partir du lait cru collecté localement (FLL).

Gel de concentration : T = 4,81% ; C = 2,7%.

Gel de séparation : T = 15% ; C = 4%

1 : échantillon du fromage au stade J = 0

2 : échantillon du fromage au stade J + 6

3 : échantillon du fromage au stade J + 12

4 : échantillon du fromage au stade J + 15

5 : échantillon du fromage au stade J + 20

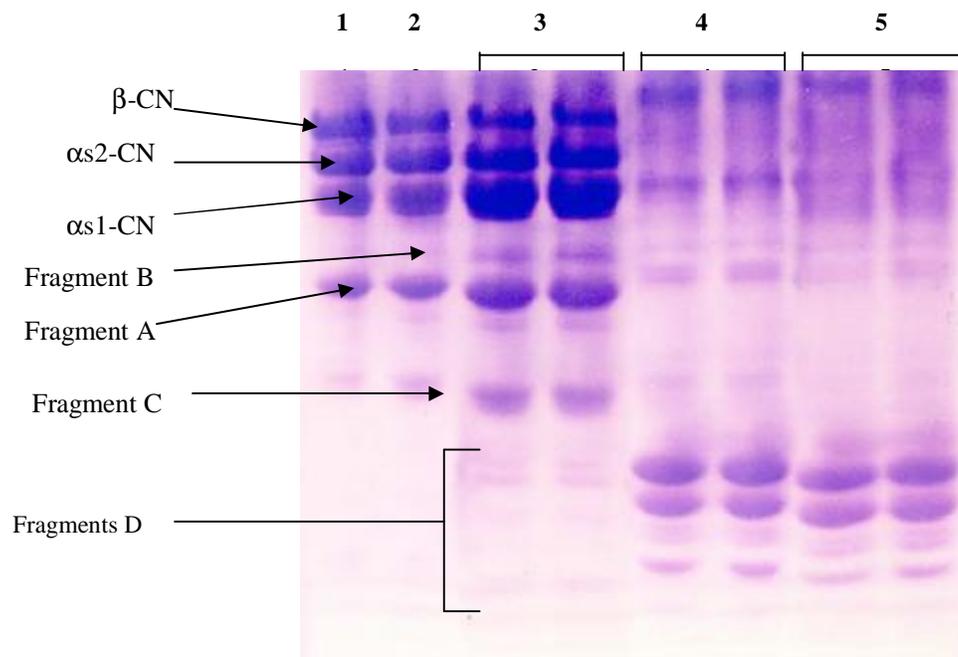


Figure 24 : Comportement électrophorétique en PAGE – Urée des protéines issues de la partie interne du *Camembert* fabriqué à partir du lait cru collecté localement (FLL).

Gel de concentration : T = 4 ; 81% ; C = 2,7%

Gel de séparation : T = 15% ; C = 4%

1 : échantillon du fromage au stade J = 0

2 : échantillon du fromage au stade J + 6

3 : échantillon du fromage au stade J + 12

4 : échantillon du fromage au stade J + 15

5 : échantillon du fromage au stade J + 20

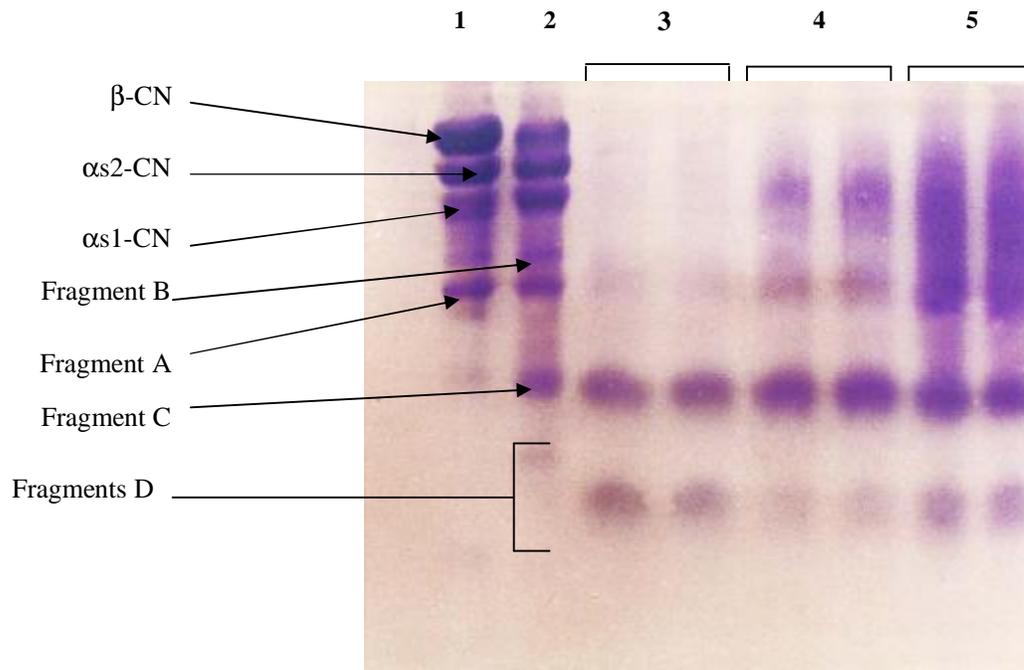


Figure 25 : Comportement électrophorétique en PAGE – Urée des protéines issues de la partie superficielle du *Camembert* fabriqué à partir du lait mixte (FLM).

Gel de concentration : T = 4,81% ; C = 2,7%

Gel de séparation : T = 15% ; C = 4%

1 : échantillon du fromage au stade J = 0

2 : échantillon du fromage au stade J + 6

3 : échantillon du fromage au stade J + 12

4 : échantillon du fromage au stade J + 15

5 : échantillon du fromage au stade J + 20

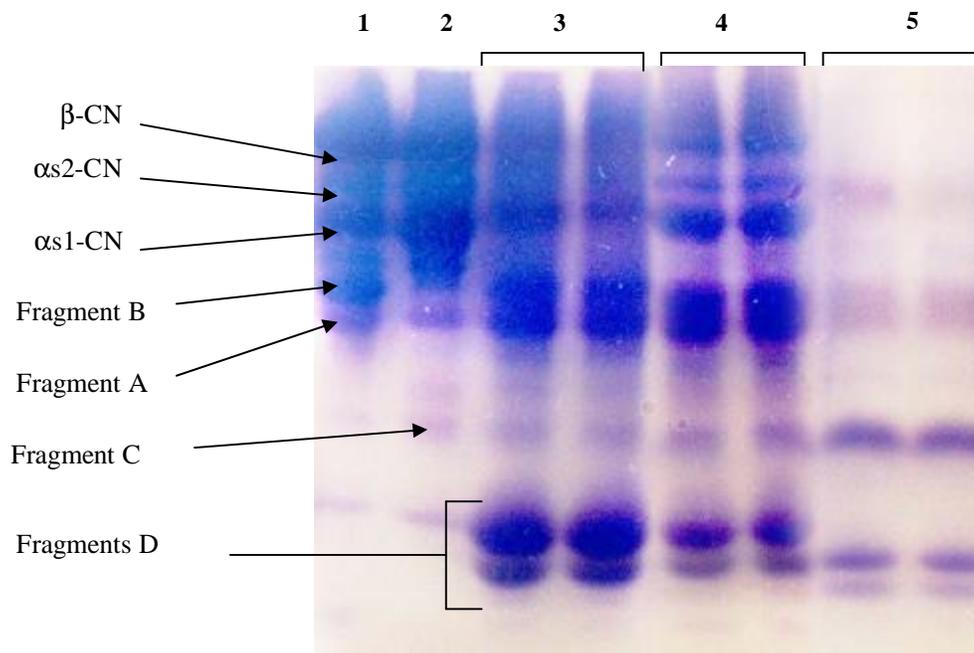


Figure 26 : Comportement électrophorétique en PAGE – Urée des protéines issues de la partie interne du *Camembert* fabriqué à partir du lait mixte (FLM).

Gel de concentration : T = 4,81% ; C = 2,7%

Gel de séparation : T = 15% ; C = 4%

1 : échantillon du fromage au stade J = 0

2 : échantillon du fromage au stade J + 6

3 : échantillon du fromage au stade J + 12

4 : échantillon du fromage au stade J + 15

5 : échantillon du fromage au stade J + 20

3.3. Discussion générale :

3.3.1. Importance des étapes antérieures à l'affinage :

Le procédé, tel qu'il est pratiqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda et qui permet de fabriquer un fromage à pâte molle type *Camembert*, est en fait le résultat d'essais et d'optimisations effectués sur place ("in situ") par les techniciens fromagers pendant plusieurs années.

Avec la variabilité de la matière première (type, nature et origine du lait utilisé) et des ingrédients de fabrication (ferments, présure), le diagramme de fabrication a subi des réaménagements au fur et à mesure que des contraintes sanitaires, physico-chimiques et technologiques ont été mises en évidence par les contrôles opérés aux différents niveaux d'élaboration du fromage.

Ainsi, en considérant les étapes antérieures à l'affinage, il est possible de relever les points d'appréciation suivants :

- l'application d'un traitement de pasteurisation à un barème de 85°C pendant 20 secondes pourrait se justifier par le souci accordé par les fromagers à la réduction des charges microbiennes élevées des laits de collecte. A noter que ceux-ci constituent des mélanges de plusieurs livraisons présentant parfois des qualités hygiéniques suspectes dues aux conditions souvent défavorables liées à l'animal, au climat, à l'environnement de la traite, au transport...etc.

Les résultats obtenus par l'étude réalisée montrent que le traitement thermique tel qu'il est appliqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda induit un fort taux de dénaturation des protéines estimé à 30-35% dans le cas du lait recombinaison. Le comportement électrophorétique des protéines sériques en PAGE-native met bien en relief ce résultat. Ce traitement limite également les aptitudes du lait à la transformation technologique. En effet, SMITH *et* Mc MAHON (1996) ont confirmé qu'un chauffage sévère du lait (au delà de 80°C) peut avoir des répercussions sur les opérations technologiques notamment :

- le complexe formé entre la β -lactoglobuline et la caséine κ s'oppose par encombrement stérique à l'action de la chymosine ;

- la diminution de la concentration en calcium soluble rend plus difficile la création des liaisons entre micelles lors de la formation et du durcissement du gel ce qui engendre une augmentation du temps de prise ;

- diminution de la rigidité finale du coagulum ;

- diminution de l'égouttage spontané du coagulum.

En outre, des effets néfastes sur d'autres nutriments, notamment les vitamines et les éléments minéraux ont été aussi rapportés par GLAESER (1992).

De ce fait, et pour avoir un lait répondant aux qualités requises pour la transformation fromagère, les industriels doivent plutôt agir en amont de la chaîne de fabrication, en veillant sur l'état sanitaire des vaches laitières, en améliorant les conditions de la traite et surtout en généralisant l'emploi de la réfrigération au niveau des fermes d'élevage et du transport du lait vers les unités de transformation.

Il est aussi recommandé d'opérer par des traitements de thermisation ménagés et de bactofugation.

Dans tous les cas, même si la pasteurisation haute paraît judicieuse pour assurer la qualité hygiénique du produit, il faudra veiller dans ce cas au respect "pratique" du barème : (température / temps).

- l'étape de prématuration pratiquée à l'unité pendant 12 à 16 heures à une température de 10-12°C consiste en une phase de revivification des cellules bactériennes du ferment, modifiées par le traitement de lyophilisation qu'elles ont subi (ferments lyophilisés) (COGAN, 1980). En effet, c'est pendant ce temps que ces bactéries lactiques synthétisent leurs propres enzymes protéolytiques (phase de latence) qui libèrent des acides aminés et des petits peptides, servant de substrat pour la prolifération de ces micro-organismes afin qu'ils puissent participer à l'étape de la coagulation (MIETTON *et al*, 1994).

Il faut toutefois veiller à inhiber le développement de germes indésirables. Pour cela, il est conseillé en fromagerie, d'assainir le lait dès son arrivée à la ferme, en appliquant un traitement de thermisation (MIETTON, 1986 ; BERTRAND, 1988) ;

- l'addition préalable de CaCl_2 au lait destiné à la fabrication du fromage permet de rétablir l'organisation de la structure micellaire, par la réinsolubilisation de caséines et minéraux solubilisés sous l'effet du froid (MIETTON, 1986). Ceci permet la réduction du temps de coagulation ainsi qu'une plus grande fermeté du gel.

Toutefois, l'apport de doses exagérées peut fortement ralentir l'exsudation du sérum en fin d'égouttage (MIETTON *et al*, 1994). Il est à signaler que les quantités ajoutées au lait, à l'unité de Draa Ben Khedda, se situent dans des limites tolérées (10 g de CaCl_2 anhydre pour 100 litres de lait) ;

- l'utilisation d'une présure commerciale lyophilisée avec les contraintes financières liées au recours à son importation, font que cette enzyme pose des problèmes réels à notre industrie laitière. Il s'avère ainsi impératif de recourir à des enzymes de remplacement.

En effet, de multiples protéases animales, végétales et microbiennes sont susceptibles de provoquer la coagulation du lait. Les protéases d'origine animale et les protéases d'origine microbienne notamment celles extraites d'*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei* sont de loin les plus utilisées (MIETTON *et al*, 1994).

A ce titre, une étude expérimentale a été réalisée au sein de l'unité de DBK par LAMARI (1997), en utilisant la protéase du *Mucor miehei*. Elle a abouti à des résultats prometteurs. Une autre étude, menée par BENGANA (2001), a montré que la substitution de la présure par la pepsine bovine, permet de fabriquer des fromages présentant des caractéristiques organoleptiques intéressantes, d'où l'idée de recourir dans les prochaines années à l'utilisation à grande échelle de cette enzyme.

Signalons toutefois que les préparations coagulantes d'origine végétale (ficines du latex du figuier, papaïne extraite des feuilles du papayer...) sont rarement utilisées, en raison de leur pouvoir coagulant très variable, de leur activité protéolytique élevée mais aussi de l'arrière goût particulier qu'elles confèrent au produit (RAMET, 1990) ;

- au cours de la fabrication des deux types de fromages étudiés (FLL et FLM), la mesure de l'acidité a révélé qu'à la fin de l'étape de la maturation, les valeurs sont de l'ordre de 19-20°D pour FLL et 25-26°D pour FLM. Les temps de prise sont respectivement de 12 et 10 min.

Ainsi, ce niveau d'acidité plus élevé du caillé à base du lait mixte a donné lieu à un coagulum d'égouttage légèrement plus prononcé et donc plus ferme.

Ces constatations concordent avec les conclusions de LABELLE (1990) qui précise qu'un mélange de lait frais en quantité inférieure ou égale à celle du lait recombinaison, améliore la cohésion du caillé ;

- de ces aptitudes technologiques précitées transparaissent les intérêts de l'utilisation du lait mixte qui se résument en :

- augmentation de la valeur nutritionnelle du produit fini par l'enrichissement de la composition du lait en extrait sec notamment en protéines ;

- amélioration du rendement fromager par suite à l'augmentation de la teneur en caséines du lait. Ceci a été d'ailleurs constaté par les essais de fabrication que nous avons réalisés à l'usine, des deux productions réalisées (FLL, FLM);

- enfin, cette façon d'opérer donne la possibilité aux pays à faible production en lait frais d'avoir des fabrications fromagères appréciables (en quantité et en qualité).

Toutefois, ces objectifs ne peuvent être atteints que par l'utilisation d'une poudre écrémée de type "low heat" dont le traitement thermique subi est de nature à apporter

moins de préjudice à sa composition. En sus, pour les fabrications à pâte molle, l'apport du phosphate monocalcique est nécessaire (SHALABI *et* FOX, 1982 ; LABELLEE, 1990) ;

- enfin, il est à noter que l'adoption d'autres procédés de fabrication, autre que la méthode traditionnelle suivie à l'usine, permettrait de mieux limiter les pertes du rendement et l'amélioration de la qualité des fabrications.

Dans ce cadre, signalons qu'il existe une technique utilisant un procédé dit MMV (Maubois-Mocquot-Vassal) dont le principe consiste à réaliser une concentration du lait en protéines et en matières grasses par une ultrafiltration sur membranes. L'enrichissement du rétentat est conduit jusqu'à atteindre la composition du caillé. Les avantages de ce procédé, par rapport au système traditionnel, ne sont pas négligeables :

- augmentation substantielle du rendement en raison de l'incorporation au fromage de la totalité des protéines du lait (y compris les protéines solubles) ;

- augmentation de la valeur nutritionnelle du fromage, les protéines du sérum étant plus riches que les caséines en acides aminés indispensables, notamment en acides aminés soufrés et en lysine ;

- plus grande régularité du poids des pièces de fromages et par suite, une meilleure valorisation du lait (LENOIR *et al*, 1983).

3.3.2. Appréciation de la phase d'affinage :

Il est entendu, au vu des résultats obtenus, que l'évolution du fromage au cours de l'affinage, particulièrement l'activité protéolytique, dépend de ses caractéristiques physico-chimiques, de la succession de la microflore et aussi des conditions du milieu environnant.

Nous avons constaté que le phénomène de protéolyse étudié se poursuit d'une manière progressive durant la période de maturation prolongée jusqu'à 20 jours. Cette dégradation des protéines se localise d'abord en surface du fromage avant qu'elle ne se développe après le 12^{ème} jour en profondeur.

Cette allure qui devient très notable à partir du sixième jour d'affinage, paraît identique pour les deux types de *Camembert* testés (FLL et FLM). En effet, à ce stade, la croissance accentuée de la flore fongique, constituée principalement de *Penicillium*, provoque la désacidification de la croûte du *Camembert*. Ainsi, deux niveaux de protéolyse sont à distinguer :

a. la remontée du pH au voisinage de la neutralité en surface, permet l'implantation de la flore acidosensible et halotolérante et l'activité optimale de la plupart des enzymes protéolytiques. Ceci induit une forte dégradation des protéines de la pâte. Les profils électrophorétiques obtenus en PAGE-Urée ont montré d'ailleurs une disparition

progressive des bandes correspondant aux caséines majeures, et en parallèle, l'apparition de plusieurs fragments peptidiques. Cette forte protéolyse est également illustrée par les taux élevés de groupements NH₂ mesurés par la méthode au TNBS, au niveau de la croûte;

b. du fait de l'acidité persistante dans la masse, l'activité protéolytique y reste faible. Ainsi, les niveaux de protéolyse enregistrés seraient attribués au phénomène de migration centripète des produits d'hydrolyse formés en surface.

Il est à noter qu'une dégradation plus poussée des caséines est enregistrée au stade (J+20) dans la masse du fromage élaboré à base du lait cru collecté localement, par rapport à celle du fromage au lait mixte. Cette différence pourrait s'expliquer par une élimination importante de la charge microbienne de ce dernier, particulièrement lors de la transformation du lait en poudre (GINZINGER *et al*, 1999).

Aux stades avancés de maturation, la contribution de la flore lactique, prédominante tout au long de ce processus, devient appréciable notamment dans la phase secondaire de la protéolyse.

L'utilisation de la méthode au TNBS nous a permis de mieux mettre en valeur les différences entre les niveaux de protéolyse des stades d'affinage étudiés. C'est ainsi que des teneurs en groupements NH₂ libres importantes sont obtenues au bout de 20 jours de maturation comparativement à celles enregistrées durant la période habituellement appliquée à l'usine (12 jours).

Cette technique, qui présente une bonne corrélation avec la méthode de Kjeldahl pour le dosage de l'azote soluble, est plus avantageuse car elle est sensible, reproductible et relativement facile à mettre en œuvre. Elle offre à ce titre, un maximum de garantie pour doser l'activité protéolytique du fait qu'elle tient compte de toute liaison rompue (SEMINEGA *et al*, 1985).

L'activité protéolytique se poursuit également au niveau d'un *Camembert* affiné à 12 jours, et entreposé pendant une semaine à basse température (6-10°C) dans une enceinte réfrigérée. Ces conditions ne semblent pas bloquer totalement les réactions microbiennes et enzymatiques, comme suggéré par RAMET (1997), même si la protéolyse est plus affectée par le froid que la lipolyse qui peut se poursuivre à vitesse appréciable au voisinage de 0°C (WEBER *et* RAMET, 1990).

Néanmoins, le nombre de groupements NH₂ relevé après 7 jours d'entreposage au froid dépasse sensiblement celui qui a été enregistré au 20^{ème} jour d'affinage (figure 27), et ce dans les deux parties (superficielle et interne) des fromages. Cette allure rapide, voire

non contrôlée de la protéolyse dans l'enceinte réfrigérée pourrait être incriminée au déséquilibre induit dans le développement de la flore microbienne, marqué par une forte prolifération des levures et des moisissures, suite à l'accroissement du taux d'humidité dans ces conditions (BOURGEOIS *et* LEVEAU, 1991). Une telle allure n'est pas favorable car elle est susceptible de détériorer la qualité organoleptique des *Camemberts* entreposés (risque du développement d'amertume...) (MOLIMARD *et al*, 1997 ; ENGEL *et al*, 2001a).

A ce titre, signalons qu'une évaluation sensorielle a été effectuée à la Laiterie de Draa Ben Khedda par le biais d'un jury de dégustation composé de 7 techniciens et agents du personnel de l'unité. Les résultats (consignés en annexe 18) vont dans le sens d'une meilleure maturation des fromages affinés au hâloir pendant 20 jours, avec une appréciation légèrement supérieure pour ceux provenant du lait frais collecté localement.

Il est intéressant de relever dans ce volet que les conclusions auxquelles nous sommes arrivés rejoignent globalement les tendances rapportées par MASUDA *et al* (2001) qui estiment que la durée optimale d'affinage du *Camembert* au lait bovin se situe entre 20 et 30 jours.

Notons toutefois que l'industrie fromagère peut pallier au problème lié à la durée de maturation, en adoptant des techniques d'affinage accéléré par l'utilisation de protéases exogènes et l'augmentation du nombre de bactéries lactiques. Il faut toutefois éviter les défauts et accidents de fabrication liés notamment aux pertes du rendement et l'apparition d'amertume (EL SODA, 1993).

L'évaluation sensorielle des fromages entreposés au froid (6-10°C) pendant une semaine montre :

- une détérioration de l'aspect suite au développement excessif du feutrage mycelien qui se manifeste par une texture coulante du fromage dans sa partie interne (sous-croûte). Ceci est valable notamment pour le *Camembert* élaboré à partir du lait frais local ;
- une meilleure appréciation des dégustateurs par rapport au produit à base de lait mixte et une perception d'un début d'amertume dans le fromage au lait frais.

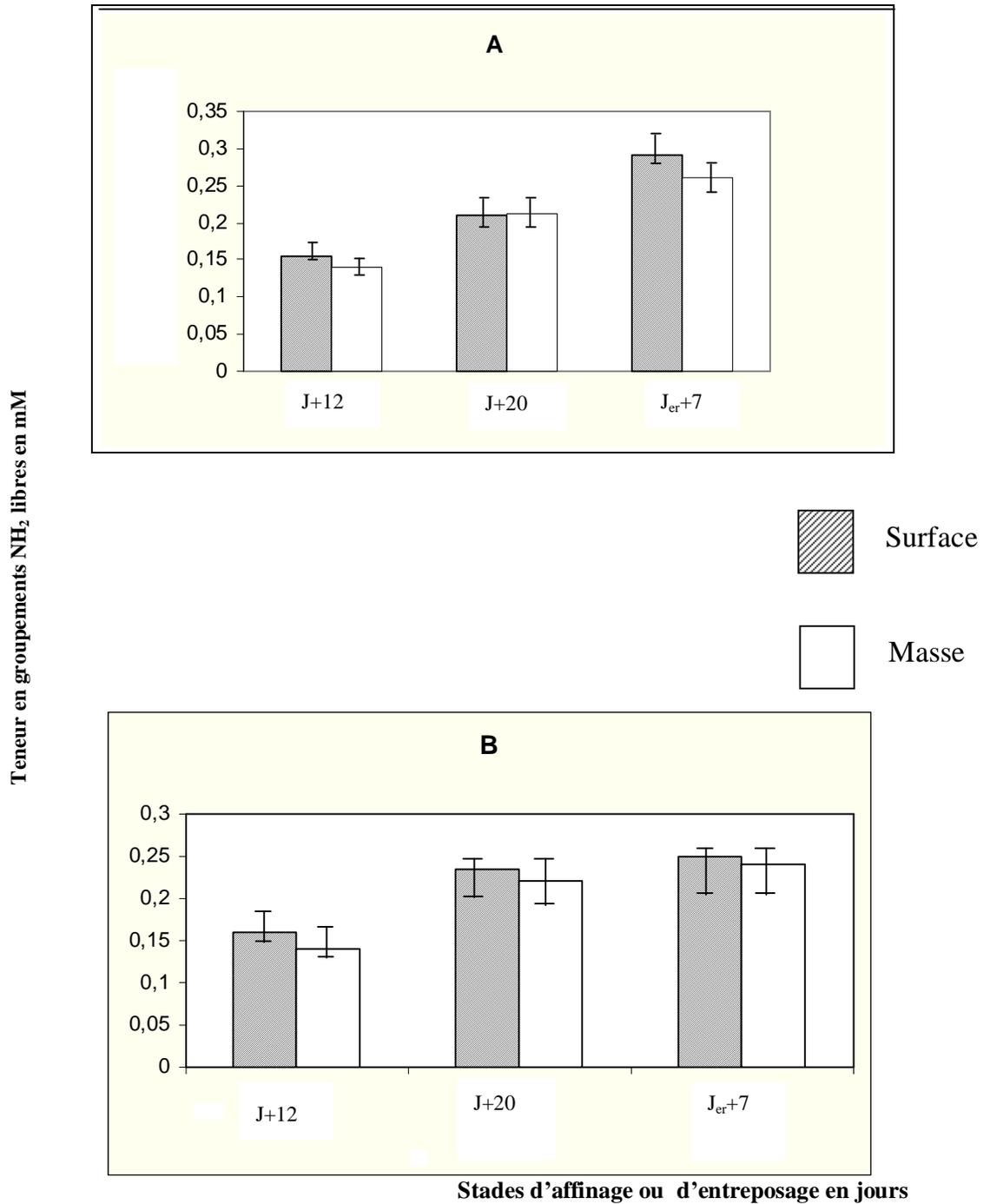


Figure 27 : Evolution comparative de la teneur en groupements NH₂ libres lors d'un affinage jusqu'à 20 jours et d'un entreposage réfrigéré pendant une semaine du Camembert affiné à 12 jours.

A : Camembert issu du lait cru local (FLL).

B : Camembert issu du lait mixte (FLM).

Cette évaluation sensorielle suggère que l'évolution des activités protéolytiques et lipolytiques dans une enceinte non contrôlée (même si la température est basse) ne va pas souvent dans le sens du développement des caractéristiques organoleptiques recherchées, pour le cas du *Camembert*.

Par ailleurs, nous estimons que les approches suivies par cette étude, qui s'intéresse à un volet important mais complexe qui est la maturation d'un fromage du type *Camembert*, doivent être complétées par d'autres techniques appropriées permettant l'évaluation de la lipolyse et la mise en évidence (et le dosage) des métabolites produits lors de la maturation. Ces derniers sont en général des composés responsables de la flaveur, de la saveur et de la consistance du produit élaboré.

Dans ce cadre, signalons que de nombreuses techniques analytiques permettent d'identifier et de quantifier les différents composés élaborés dans les réactions de transformation du lait au fromage. Ainsi, les acides gras libérés par la lipolyse contribuent à la flaveur finale du *Camembert* et leur teneur est fortement corrélée à l'intensité de l'arôme. Ces métabolites ont été quantifiés dans ce type de fromage par LESAGE *et al* (1993), en réalisant une séparation chromatographique en phase gazeuse (CPG). Il a été montré que la libération de l'acide oléique (C18 :1) est la plus abondante avec un taux de 32,6% des acides gras au bout de 22 jours d'affinage, suivie de celle de l'acide palmitique (23,3%) (figure 28).

En outre, ces acides gras sont les précurseurs des méthylcétones, d'alcools, lactones et esters (MOLIMARD *et al*, 1997) qui ont été isolés et mis en évidence par les travaux de DUMONT *et al* (1974), en utilisant la distillation sous vide.

D'autres travaux ont permis de considérer que les méthylcétones, les alcools secondaires, les composés phénoliques (tel le 2-phényl-éthanol), certains composés soufrés (tel le dithiapentane), les acides butyriques et hexanoïques sont parmi les composants majeurs de l'arôme du *Camembert* (figure 29) (LENOIR *et al*, 1983 ; ARMENDARIZ *et COCHET*, 1993 ; PERES *et al*, 2001).

Néanmoins, ces métabolites issus de la lipolyse ne sont pas les seuls impliqués dans l'arôme des fromages. Les produits de la dégradation des protéines et des acides aminés, comme les composés soufrés, alcools, aldéhydes et amines ont également un rôle très important, de même que les composés issus de la dégradation du lactose (MOLIMARD *et SPINNLER*, 1996).

Dans cette optique, la filtration sur gel, l'ultrafiltration, les techniques de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et l'extraction supercritique

des fluides permettent d'isoler la fraction non volatile soluble dans l'eau, reconnue comme facteur essentiel de l'intensité de la flaveur.

Il est établi que, parmi les produits d'hydrolyse, les peptides hydrophiles jouent un rôle important dans le développement de la flaveur, tandis que les peptides hydrophobes sont reconnus comme étant la cause de l'apparition de l'amertume dont un composé comme la cadavérine, est l'amine biogène majeure dans le *Camembert* (ARMENDARIZ et COCHET, 1993 ; ENGEL *et al*, 2001b).

Conclusion générale

A travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à l'appréciation de la qualité du fromage à pâte mole type *Camembert* tel qu'il est élaboré à la Laiterie de Draa ben Khedda, soit exclusivement à partir du lait frais collecté localement, soit à partir du lait mixte, constitué par le mélange à parts égales entre le lait frais et le lait recombinaison.

Cette appréciation a ciblé l'état de maturation du *Camembert* au cours de la phase d'affinage. Elle a été réalisée, d'une part, par l'analyse des paramètres physico-chimiques du fromage à travers les différents stades d'affinage, aussi bien pour la croûte superficielle du produit que pour sa partie interne et, d'autre part, par l'évaluation qualitative et quantitative de l'activité protéolytique s'y déroulant dans cette étape clé. Il est entendu que cette évaluation est en relation avec le développement des groupes microbiens, qui contribuent par leur activité à assurer au produit final l'ensemble de ses caractéristiques organoleptiques recherchées.

Les investigations entreprises ont aussi porté sur la qualité physico-chimique et nutritionnelle des laits destinés à la fromagerie et l'effet du traitement de pasteurisation tel qu'il est pratiqué à l'unité sur ces matières premières.

Les analyses opérées sur les produits de départ ont montré que l'un des avantages majeurs du recours au lait mixte se situe dans la correction du taux protéique faible (25-30g/l en moyenne), relevé régulièrement dans la composition du lait cru local acheminé à l'usine. Néanmoins, la nature de la poudre à incorporer dans la recombinaison du lait doit être d'excellente qualité car, nous avons montré que le traitement de pasteurisation haute (85°C/20s) tel qu'il est conduit engendre un taux de dénaturation des protéines, particulièrement élevé (estimé à 30-35%) dans le cas du lait recombinaison seul (contre 8-10% pour le lait cru à 100%). Ces tendances sont d'ailleurs vérifiées par le comportement électrophorétique des protéines solubles qui, perdent dans le cas de la dénaturation, leur aptitude à la focalisation en bandes fines, nettes et bien séparées.

Concernant le suivi de la maturation du *Camembert* et l'expression de ses qualités intrinsèques qui font sa renommée, les résultats obtenus par la présente étude confirment les principales tendances auxquelles sont arrivées les investigations antérieures entreprises au laboratoire (LABAB), indépendamment de la variabilité de la matière première utilisée et des approches analytiques mises en œuvre.

Les essais réalisés ont montré que l'activité protéolytique, mesurée par une méthode de dosage au TNBS et par l'examen du comportement électrophorétique des caséines en PAGE-Urée, est plus importante en surface qu'en profondeur du fromage et ce, indépendamment de la nature du lait utilisée pour son élaboration. Cette protéolyse est intense à partir du sixième jours d'affinage et continue à se faire de façon progressive (et centripète) jusqu'au dernier stade testé (20 jours). Ce résultat prouve encore une fois, que le niveau de maturation du produit au stade J+12 (qui correspond à la limite pratiquée à l'usine) est insuffisant pour conférer à ce produit dérivé l'ensemble de ses qualités.

Cette protéolyse, bien que continuant à se dérouler dans le cas du *Camembert* affiné à 12 jours et entreposé pendant une semaine dans une enceinte réfrigérée, ne semble pas, au vue du test de dégustation réalisé, conduire aux mêmes métabolites du fait du déséquilibre mesuré de la flore microbienne, probablement suite au développement dans le milieu de germes indésirables.

Par ailleurs, l'étude n'a pas révélé de différences sensibles dans l'évolution des paramètres étudiés entre les deux types de fromage testés (à base de lait frais ou de lait mixte). Bien que l'évaluation sensorielle montre une préférence au fromage élaboré à partir du lait frais collecté localement, il n'en demeure pas moins que le lait mixte semble présenter de bonnes aptitudes à la transformation fromagère auxquelles s'ajoute une meilleure valeur nutritionnelle.

Néanmoins, les conclusions nées de cette étude, qui ont ciblés un volet essentiel de la phase de maturation des fromages à savoir la protéolyse, gagneraient à notre sens à être consolidées par l'entremise d'investigations complémentaires sur l'évaluation de l'activité lipolytique et le dosage des métabolites produits, aussi bien par la chromatographie en phase gazeuse, que par le recours à l'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et l'électrophorèse capillaire (HPCE).

Références bibliographiques

ABARKANE A. (1997) .contribution à l'étude de la protéolyse au cours de l'affichage du fromage à pâte molle type camembert fabriqué à l'unité ORLAC de Draa ben khedde. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université de tizi ouzou.

ACKER L.W (1996). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques de la biologie de l'affichage ; in : « le fromage » technique et documentation, Lavoisier, 3ème édition, paris.

ADDA J et DUMONT J.P. (1974).les substances responsables de l'arôme des fromages à pâtes molles .lait ; 531 ; 1-21.

ADLER-NISSEN J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid .journal of agriculture and food chemistry

AFNOR (1980).recueil des normes françaises .lait et produits laitiers.

ALAIS C. et LINDEN G. (1993). Biochimie alimentaire. Masson ,2ème édition paris.

ANDREWS A.T. (1979). The formation and structure of some proteose –peptone components. Journal of dairy research, 46,215-240.

ARDO Y .MEISEIL H (1991).methods for direct measurement of peptid bond cleavage in cheese .international dairy federation, 216, 10-13.

ARMENDARIZ G.B. et COCHET N. (1993).fromage : la tradition à la base de l'innovation bio futur, 119,27-29.

BAROILLER C. SCHMIDT J. L. (1990).contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de camembert. Lait, 70,67-84.

BENGANA M. (2001).caractérisation des enzymes protéolytiques (pepsine/chymosine) isolées à partir des caillettes de bovins adultes. mémoire de magister en sciences agronomiques .institut national d'agronomie, El-Harrach, Alger

BERTRAND F. (1988).le fromage grand œuvre des microbes .revue générale de froid, 78,519-527.

BIKKER J.F ANEMA S.G.LI Y and HILL I.P.(2000).thermal dénaturation of b-lacoglobulin A,B and C in heated skim milk milchwissenschaft, 55 (11),169.

BOURDIER J. M LUQUET M.F (1991).dictionnaire laitier. Techniques et documentation, Lavoisier, 2éme édition, Paris.

BOURGEOIS C. et LEVEAU J. Y (1991).Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Techniques et documentation ; Lavoisier, Paris.

BOUTON Y. et GRAPPIN R. (1994). Measurements of proteolysis in cheese relationship between phosphotungstic acid soluble N fractions by Kjeldahl and 2, 4, 6,-trinitrobenzensulphonic acid- relative groups in water-soluble N. Journal of Dairy research, 61, 437-440.

BOUTROU R. GAUCHERON F. PIOT M. MAUBOIS J. and LEONIL J. (1999). changes in the composition of juce expressed from *Camembert* cheese during repining. Lait, 795), 465-552.

BRINGON G. RIBADEAU-DUMAS B. MERCIER J.C et PELISSIER J.P (1977). Complete amino acid sequence of bovine α_{s2} -casein. F.E.B.S. Letters, 76, 274-279.

CAYOTP. Et LORIENT D. (1998). Structures et thechnofonctions des protéines du lait. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

CERNING J. GRIPON J.C et LAMBERT G. et LENOIR J. (1987). Les activités biochimiques de penicillum utilisés en frmagerie. Lait, 67, 3-39.

CHEFTEL J.C. ; .CUQ J.L et LORIENT D (1985). Protéines Alimentaires. Edition Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

CHILLIARD Y. et LAMBERT G (1984). La lipolyse dans le lait. 64, 544-578.

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

CHOISY C. ; DESMAZEAUD M. et GRIPON J.C. (1987). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de l'affinage ; in : « Le Fromage ». Techniques et Documentation, Lavoisier.

CHOISY C. DEZMAZEAUD M. et GRIPON J.C. (1990). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de l'affinage in “Le Fromage”. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

CHOISY C. DEZMAZEAUD M. et GRIPON J.C. (1990, LAMBERET G. et LENOIR J (1997). La biochimie de l'affinage; in “Le Fromage”. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

COGAON T.M (1980). Les levains lactiques mésophiles. Lait, LX, 397-425.

CREAMER L.K and RICHARDSON B.C (1974). Identification of the primary degradation product of α_{s1} casein in the Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 11, 30-39.

CREAMER L.K and OLSON N.F (1982). Reological evaluation of maturing Cheddar cheese. Journal of Food Science, 47, 631-636.

DEBEUKELAR N. J, COUIN M.A; BRADLEY R.L. and MARTH E.A (1977). Modification of milk proteins by psychrotropic bacteria. Journal of Dairy Science, 60, 857— 861.

DEETH H.C; FITZGERALD C.H and WOOD A.F (1975). A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. Australian Journal of Dairy Technology, 30(9), 109- 11.

DEJONG. L and DEGROOT-MOSTERT A.E.A. (1977). The proteolytic action of rennet on different casein substrates under various conditions. Netherland Milk and Dairy Journal, 3 1, 296.

DELOBETTE H., FRIRY A.; PLEWNIAK et EGLY J. M (1991). Le dosage des protéines. Biofutur, 41, 3-11.

DEZMAZEAUD M.J. (1982). Les bactéries lactiques; recherche et application industrielle en agro-alimentaire. Colloque APRIA du 12-13 septembre 1992, Caen, France.

DEZMAZEAUD M.J. et SPINLER E. (1997). Les enzymes dans la fabrication des aliments Lait et produits laitiers ; in « Les enzymes en Agro-alimentaire ». Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

DEZMAZEAUD M. et GRIPON J.C.; LE BARS D. et BERGERE J.L. (1976). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages ; III- Influence des micro-organismes. Lait, 56, 379.

DESNOUVEAUX R. DRIUO A. et LINDEN C. (1986). Point actuel sur le rôle des enzymes dans la maturation et l'affinage des fromages. Industrie Agricole et Alimentaire, Il 2, 91 1—92 I

DEWIT J.N et HONTELEZ –BACKX E. (1981). Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum conséquences des traitements thermiques. Techniques Laitières, 952, 19-22.

DONOVAN M. and MULHIVEL D.M. (1987). Thermal denaturation and aggregation of whey protein. Irish Journal of Food Science and Technology, 11,87-100

DUMONT J.P. ROGER S. CERF P. et ADDA J. (1974). Etude des composés neutres volatils présents dans le *Camembert*. Lait, 38, 503-538.

ECK A. (1990). Le Fromage 3^{ème} Edition, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

EIGEL W.N. (1977). Effect of bovine plasmin on α_s1 (B) and κ (A) caseins. Journal of Dairy Science, 60, 1399.

ELISKASES –LECHNER F.. GINZINGER W. ROHM H. and TSCHAGER E. (1999). Raw milk flora affects composition and quality. Lait, 794, 361-464.

EL SHEIKH M.;DUCRUET J. L and MAUBOIS J.L (1994). Manufacture of raw cheese from fresh and recombined milks. Lait, 74, 241-312.

EL SODA M. (1993). Accelerated maturation of cheese. International Dairy Journal, 93, 53 1.

EIGEL E. NICKLAUS S. SEPTIER C.. SALLES C. and LE QUERE J.L. (2001a). Evolution of the taste of a bitter *Camembert* cheese during ripening characterization of a matrix effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2930-2939.

EIGEL E. TOURNIER C. SALLES C .and LE QUERE J.L (2001 b). Evolution of the composition of a selected bitter *Camembert* cheese during ripening release and migration of taste-active compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2940-2947.

EXTERKATE F.A (1983). The proteolytic system of starter streptococci the crucial point in cheese making. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 37, 94-96.

FEENY E.P. FOX P.F and GUINEE T.P. (2001). Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: I- composition and proteolysis. *Lait*, 81(4), 463-474.

FEUILLAT M. LE GUENNEC S et OLSSON A. (1976). Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidence sur le rendement de fabrication de fromages à pâte molle. *Lait*, 55, 521-536.

GINZINGER W. JAROS D., LAVANCHY P and ROHM H. (1999). Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidence sur le rendement de fabrication de fromages à pâte molle. *Lait*, 55, 521-536.

GIRARDET J.M.MATI A. ETIENNE L. et LINDEN G. 1990). Fast protein liquid chromatography purification of hydrophobic fraction of bovine milk protease-peptone and characterization by bidimensional electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 58, 85-98.

GLAESER H. (1992). La pasteurisation du lait a-t-elle une influence négative sur la qualité fromagère ? *DMZ- Leben Smilttelindustrie and Milkwirtschaft*, 113, 13.

GRAPPIN R.; RANK T.C and OLSON N.F (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. *Journal of Dairy Science*, 68, 531-540.

GREEN M.L and FOSTER P.M.D (1974). Comparison of the rates of proteolysis during cheese ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research*, 41, 269-282.

GRIPON J.C .DEZMAZEAUD M.J.LE BARS D. BERGERE J.L (1976). Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lacits*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicollum* during cheese ripening. Journal of Dairy Science, 60, 1532-1538.

GUENGUEN M. DELEPAUL et LE NOIR. J., (1974)., GUILLOU H. PELLISIER J.P .et GRAPPIN (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. Lait, 66,143-175.

HASSOUNA M. NAFTI A et GHRIR R. (1996). L'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte fleurie de type *camembert* au lait cru de brebis aspects microbiologiques et physico-chimiques. Science des Aliments, 16, 187-203.

HEMME D. BOUILLAN C. METRO F and DEZMAZEAUD M.J. (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. Science des Aliments, 2,113-123.

HILL R, D LAHAV E. and GIVOL D. (1974). A rennin-sensitive bond in $\alpha_s1(B)$ casein. Journal of Dairy Research, 41, 147-153.

HILLIER R.M. et LYSTER R. L.J (1979). Traitements thermiques; in :« Le Fromage ». Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

HUMBERT G. and ALAIS G. (1979).). Review of progress of dairy science: the milk proteinase system. Journal of Dairy Research, 46, 559-571.

HUMBERT G; GUINGAMP M.F., KOUOMEGNE R., and LINDEN G. (1990). Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. Journal of Dairy Research, 57, 143-148.

LABADEN H. (2000). Evaluation de l'activité protéolytique et lipolytique au cours de l'affinage du fromage à pâte molle type *camembert* fabriqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda. Mémoire de Magister en Biochimie. Université de Bedjaia.

KAMINOGAWA S. MISOBUCHI H and YAMAUCHI K. (1972). Comparison of bovine milk protease with plasmin. Agricultural Biology and Cliemistiy.36, 2 163-2167.

KAMINOGAWA S. YAMAUCHI K., MISAWA A.S and KOYA Y. (1980). Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. Journal of Dairy Science, 63, 1855-1877.

KELLY A.L. (1999). The influence of heat treatment of milk on proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Milchwissenschaft*, 54 (42), 254-268.

KIKUCHI T et TAKAFUJI S. (1971). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques de la biochimie de l'affinage; in "Le Fromage". Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

KHUCHROO C. N., RAHILLY J. And FOX P.F. (1983). Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 1, 129.

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

LABLEE J. (1990). L'utilisation de lait reconstitué ou reconstitué : la fabrication des fromages; in : "Le Fromage". Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

LAEMMLI U.K and FAVRE H (1973). Maturation of the heat of bacteriophage T₄ DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*, 80, 575-599.

LAMARI F. (1997).). Etude comparative de l'influence de deux enzymes coagulantes sur les paramètres technologiques et physico-chimiques dans la fabrication de fromage. Mémoire d'ingénieur en Technologie Alimentaire. Institut National d'Agronomie, El Harrach, Alger.

LAMBERT G. LENOIR. (1976). Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicolum*. Purification et propriétés de la lipase majeure. *Lait*, 56,622-644.

LANE C. and FOX P.F. (1999). The individual or combined action of chymosin and plasmin on sodium caseinate or β -casein in solution : effect of NaCl and pH. *Lait*,79 (4), 423-434.

LAW B.A. (1979). Review of the progress in Dairy Science; enzymes of psychrotrophic bacteria and their effect on milk and milk products . *Journal of Dairy Research*, 46, 533-588.

LE BRDS D. And GRIPON J. C. (1989). Specificity of plasmin towards bovine α_{s2} -casein. *Journal of Dairy Research*, 56, 817-821.

LE BRDS D. and GRIPON J. C. (1993). Hydrolysis of α_s1 -casein by bovine plasmine. *Lait*, 73, 337-344.

LE CLERCQ-PERLAT M.N., OUMER A. BUONO F BERGERE J. L. SPINLER H.E and 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, 1674-1683.

LEDFORD R.A. O'SULLIVAN A. and NATH K.R. (1966). Residual casein fractions in ripening cheese determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 49, 1098- 1101.

LEGRAET et BRULE. (1988). Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle type *Camembert*. *Lait* 68, 219- 234.

LEMIEUX L. and SIMARD R.D. (1994). Bitter flavour in Dairy Products. *Lait*, 72, 335- 382.

LENOIR J. (1970). L'activité protéasique dans les fromages à pâte molle de type *Camembert* . *Lait*, 275, 231-243.

LENOIR J. et AUBERGER B. (1977). Les caractères du système protéolytique *Penicillium caseicolum*. I- Pré -caractérisation de l'activité exocellulaire. *Lait*, 57, 164-183.

LENOIR J. et VEISSEYRE R. et CHOISY C. (1974). Le lait réfrigéré, matière première de fromagerie moderne. *Revue Laitière Française*, 322, 453-465.

LENOIR J. LAMBERT G et SCHMIODT J.L. (1983). L'élaboration d'un fromage :l' exemple du *Camembert*. *Pour la Science*, 69, 30-42.

LESAGE L. VOILLEY A. LORIENT D. and BEZARD J. (1993). Sodium chloride and magnesium chloride affected by ripening Of *Camembert* cheese. *Journal of Food Science*, 58(6), 1303-1306.

LINDEN G. et LORIENT D. (1994). *Biochimie Agro-Industrielle : Valorisation alimentaire de la production agricole.* Edition Masson, Paris.

LOWRY O.H. ROSEBROUGH N. J. FARR A. L and RANDELL R.J. (1951). protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265- 275.

LUQUET F.M. (1990). Lait et Produits Laitiers vache, brebis, chèvre. Tome II, Technique et Documentation, 2^{ème} Edition, Lavoisier, Paris.

MANJI .B. and KAKUDE Y. (1987). Determination of whey protein denaturation in heat- processed milks Comparison of three methods. Journal of Dairy Science, 70, 1355-1361.

MARCOS A. ESTEBAN M.A., LEON F. And FERNANDEZ-SALGUERO J. (1979). Electrophoretic pattern of European cheeses comparison and quantitation. Journal of Dairy Science, 62, 892.

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

MASUDA T. TANGUCHI T., YAMAZAKI H. R. And MORICHI T. (2001). Changes in chemical components during the ripening of *Camembert-type* cheese made from pasteurized goat's milk. Dairy Science Abstracts, 63 (6), 507.

MATI A. (1992). Les protéoses peptones dans les laits bovin, ovin et caprin isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant 3. Thèse de Doctorat de 1^{er} Université de Nancy I, France.

MATI A. MOULI –MATI F. GIRARDET J.M ., FOKOUE ., BELLEVILLE –NABET P. And LINDEN G. (1993). Mitogenic activity of hydrophobic fractions of proteose- peptone from cows, ewes and goats milk measured with MARK 3 hybridoma culture. Journal of Dairy Research, 60, 443-448.

MAUBOIS J. L et BRULE G. (1982). Modification de la teneur en protéines du lait de fabrication. Lait, 62, 351-373.

MAYER H.K, ROCHENBAUER C. and MLEAK H. (1998). Electrophoretic ripening index for the evaluation of proteolysis. Lait, 78, 425-438.

Mc SWEENEY P.L.K. and FOX P.F. (1997). Chemical methods for characterization of proteolysis in cheese during ripening. Lait, 77, 41-76.

MERCIER T.B., GROSCLAUDE F. et RIBADEAU-DUMAS B. (1971). Structure primaire de la caséine $\alpha_{S1}(B)$ bovine ; séquence complète. European Journal of Biochemistry, 23, 41-51.

MERCIER J.C., BRIGNON G. et RIBADEAU-DUMAS B. (1973). Structure primaire de la caséine κ (B) bovine; séquence complète. European Journal of Biochemistry, 35, 222-251.

MESSENS W., FOUBERT I., DEWTTINGK K and HUYGHEBAERT A.

(2000). Proteolysis of a high-pressure-treated mould ripened cheese. Milchwissenschaft, 56 (4), 201.

MIETTON B. (1986). La préparation des laits de fromagerie en technologie des pâtes molles. Industries Agricoles et Alimentaires, 10, 952-962.

MIETTON B. (1991). Transformation du lait en fromage; in “Les Bactéries Lactiques II ”. Edition Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.

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

MIETTON B., DESMAZEAUD M., DE ROISSART H. et WEBER F. (1994). Transformation du lait en fromage ; in “ Les Bactéries Lactiques II ”. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris

MIRANDA G. et GRIPON J.C. (1986). Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. Lait, 66, 1—8.

MOLLIMARD P., LEQUERE J.L. et SPINLER H.E. (1997). Les lipides et la saveur des produits laitiers. Journal of Dairy Science, 4, 301-311.

MILVIHILL M. and FOX P.F. (1977). Proteolysis of α_{S1} -casein by chymosin: influence of pH and urea. Journal of Dairy Research, 44, 533-540.

MILVIHILL M. et FOX P.F. (1979). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{S1} -casein. *Journal of Dairy Research*, 46, 641-651.

MILVIHILL D.M and DONOVAN M. (1987). Whey Proteins and their Thermal Denaturation ; a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 43-75.

NEELAKANTEN J., SHAHANI K.M., ARNOLD R.G. (1971). Lipases and flavor development in some italian cheese varieties. *Food Production Development*, 5,52-58.

NELSON J.H., JENSEN R.G and PITAS R.E. (1977).). Pregastric esterase and oral lipase a review. *Journal of Dairy Science*, 60, 327-362.

NOOMEN A. (1978). Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheese (Meshanger type). 1. Activity of milk protease. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32,26-48.

OLDFIELD D.J., SINGH H and TAYLOR M.W. (1988). Association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelles in skim milk heated in an ultrahigh temperature plant. *Journal of Dairy Research* 47, 313-325.

PARASSEN R., LORIENT F. et VIGNON B. (1994).). Influence de la concentration énergétique et azotée de la ration complète sur la production et la composition du lait de vache. *Azoa*, 43, 645.

PAQUET D. (1989). Revue bibliographique: la fraction proteose-peptone du lait. *Lait*, 69, 1-21 -

PELISSIER J.P. (1984). Protéolyse des caséines. *Sciences des Aliments*,
4 (1), 1-35

PERES C., VIALON C. and BERDAGUE J.L. (2001). Solid-phase micro extraction mass spectrometry : a new approach to the rapid characterization of cheeses *Analytical Chemistry*, 73 (5), 1030-1036.

PIEN J. (1974). Etude de la coagulation du lait par la présure. *Techniques Laitières*, 29, 835, 23-28.

PILLAY V.T., MHYR A.N. and GRAY J.L. (1980). Lipolysis in milk, determination of free fatty acids and threshold value for lipolyzed flavour detection. *Journal of Dairy Science*, 63, 1213-1223.

PIERRE A., BRULE G., FAUQUANT J. et PIOT M. (1977). L'influence des traitements thermiques sur les propriétés physico-chimiques des rétentats obtenus par ultrafiltration de lait de vache et de chèvre-t Lait, 71, 569-570.

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

POLYCHRONIADOU A. et MANOLKIDIS K.S. (1984). Etude biochimique d'un fromage de chèvre à croûte fleurie fabriqué à l'aide d'extraits coagulants microbiens. Lait, 64, 469-483.

RAYNAL K. and REMEUF F. (2000). Effect of storage at 4°C on the physicochemical and renneting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. Journal of Dairy Research, 67. 199-207.

RAMET J.P. (1997). Technologie comparée de l'affinage des différents types de fromages ; in "Le Fromage". Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

REMEUF F. (1994). Relations entre caractéristiques physico-chimiques et aptitudes fromagères des laits. Recueil de Médecine Vétérinaire, 170 (6/7), 359-365.

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

RIBADEAU -DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUD F. et MERCIER J.C. (1972). Structure primaire de la caséine f3 (A2) bovine séquence complète. European Journal of Biochemistry 25, 505-514.

RIBADEAU -DUMAS B., VASSAL et GRIPON. (1984). Maîtrise de l'affinage des fromages de type *Camembert*. Lait, 64, 448-468.

SALIH A.H.A., ANDERSON M and TUKLEY B. (1977). The Determination of short and long chain free fatty acids in milk. Journal of Dairy Research, 44, 601-605.

SHALABI S.I. and FOX P.F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. Irish Journal of Food Science and Technology, 11, 135.

SCHLESSNER J.E., SCHMIDT S.J. and SEKMANR. (1992). Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 75(7), 1753-1760.

SCHMIDT J.L. (1982). Activité protéolytique des levures isolées du fromage de Camembert. Actes du 11^{ème} Congrès Mondial de Laiterie, Volume 1 (2), Moscou.

SCHMIDT J.C. et LENOIR J. (1978). Contribution à l'étude de la flore de levure du fromage Camembert son évolution au cours de la maturation. *Lait*, 58, 355-370.

SELSELET – ATTOU G., CHILLIARD Y., BAS P. et MORAND – FEHR P. (1984).). Comparaison de deux méthodes de dosage des acides gras libres totaux du lait de chèvre. *Lait*, 64, 635-637.

SEMINEGA T., HUMBERT G., LEDEAUT J.Y. et LINDEN G. (1985). Détermination de l'activité protéolytique dans le lait et les produits laitiers. *La Technique Laitière*, 1001, 47-54.

SMITH M. and Mc. MAHON D.J (1996). Aseptic rennet coagulation of ultra high temperature processed milk concentrate. *Journal of Dairy Science*, 79, 1513-1520.

SNOEREN T.H.M and VAN RIEL J.A.M. (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α_{s2} and β casein. *Milchwissenschaft*, 34, 528-53 i

STORRY J.E., GRANDISON A.S., MILLARD D., OWEN A.J. and FORD G.D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants. *Journal of Dairy Research*, 50, 215-229.

SWAISGOOD H.E. (1982). Chemistry of milk protein; in "Developments in Dairy Chemistry". Applied Science Publishers, LONDON.

TAKAFUJI S. (1993). Protein breakdown in *Camembert* cheese. in "Food Flavors, ingredients and Composition". Edition Charalambous, The Netherlands.

THOMAS T.D and MILLS O.E. (1981). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *Microbiological Review*, 46, 425.

THOMPSON J., TURNER O. et THOMAS t.D. (1978). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques de la biochimie de l'affinage; in: "Le fromage". Techniques et Documentation, Lavoisier, 3^{ème} Edition, Paris.

TIRELI A. (1998). Improved method for the Determination of furosine in food by capillary electrophoresis. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1400-1404.

TRIEU-COUT P. et GRIPON J.C. (1982). A study of proteolysis during *Camembert* cheese ripening using isoelectric focusing and two dimensional electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 49, 501.

TRUJILLO A.J., GUAMIS B. and CARRETERO C. (1998 a). Hydrolysis of bovine and caprine caseins by rennet and plasmin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3066-3072.

TRUJILLO A.J., MIRANDA G., LE BARS D. and DE LACROIX-BUCHET A. (1998 b). Proteolytic specificity of chymosin on caprine α_{s1} -Caseins (A) and (F). *Journal of Dairy Research*, 65, 233-241.

VALDICELLI L., NEVIANI E., EMALDI G.C. (1986). Sensitivity of whey proteins to heat treatment. *Latte*, II, 953-958.

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

VEISSEYRE R. (1979). *Technologie du Lait*. 3^{ème} Edition, Maison Rustique, Paris.

VERMOREL M. (1988). L'influence de de l'alimentation sur la composition du lait ; in : « Lait et produits laitiers ». Techniques et documentation, Lavoisier, Paris.

VISSER S. and SLANGEN K.J. (1977). The specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine κ -casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 16.

VISSER F.M.W. and DE GROOT-MOSTERT A.E.A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4-protein break-down: a gel electrophoresis study. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 247.

VISSER F.M.W., NOORMAN H.J., SLANGEN K.J. and ROLLEMA H.S. (1989). Action of plasmin on bovine β -casein in a membrane reactor. *Journal of Dairy Research*, 56, 323-333.

Références bibliographiques

WALLACE D. and FOX P.F. (1994). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379-1380.

WEBER F. et RAMET J.P. (1990). Technologie comparée de l'affinage des différents types de fromages ; in : « Le fromage ». Techniques et documentations Lavoisier, Paris.

ANNEXES

Annexes 1.

L'eau de reconstitution doit respecter les normes préconisées par l'OMS :

*** la qualité physico-chimique :**

- absence de pesticides ;
- taux de chlorures inférieur à 100 mg/l ;
- taux de sulfates inférieur à 100mg/l ;
- concentration de nitrates inférieur à 45mg/l ;
- la dureté totale ne doit pas dépasser 10°F(°F : degrés français)
(1°F = 4 mg / l de calcium ou 2,4 mg / l de magnésium)

*** la qualité microbiologique :**

- absence de coliformes dans 100ml ;
- absence de germes pathogènes.

Annexe 2. Détermination de l'acidité du lait :

*** Prise d'essai :** 10ml de l'échantillon sont préparés dans un bêcher de 100ml.

*** Mode opératoire :**

- ajouter à la solution 0,3 ml de la solution de phénolphtaléine à 1% ;
- titrer avec la soude (NaOH N/9) jusqu'au virage au rose de la solution qui doit

persister pendant une dizaine de secondes.

L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) et donnée par lecture directe du volume (ml) de soude versée.

Annexe 3. Détermination de la matière grasse par la méthode acido-butyrométrique :

A. lait :

*** Mode opératoire :**

- introduire dans le butyromètre de GERBER ;
 - . 10ml d'acide sulfurique
 - . 11ml de l'échantillon
 - . 1ml d'alcool isoamylique
- fermer le butyromètre à l'aide d'un bouchon ;
- mélanger jusqu'à la dissolution totale du mélange puis centrifuger pendant 6

minutes à 1200 tours / min. le résultat est exprimé en g/l et la lecture se fait directement sur le butyromètre.

B. FROMAGE

* **Prise d'essai** : 3g de fromage sont broyés dans le godet qu'on introduit dans le butyromètre de VAN GULIK.

* **Mode opératoire** :

- introduire par l'extrémité du butyromètre de l'acide sulfurique jusqu'à ce que le niveau de l'acide dépasse le godet de 2 mm ;
- placer le butyromètre dans le bain-marie jusqu'à la dissolution totale du fromage ;
- retirer le butyromètre, agiter puis introduire 7ml d'alcool isoamylique ;
- ajouter de l'acide sulfurique jusqu'à l'avant dernière graduation du butyromètre ;
- faire des retournements puis des agitations (2 fois) ;
- placer le butyromètre dans la centrifugeuse à 1200 tours / min pendant 6 minutes ;
- la teneur en matière grasse exprimée en g/100g de fromage est donnée par lecture directe sur le butyromètre.

Annexe 4. Détermination de la teneur en lactose par la méthode de BERTRAND (1988) :

* **défécation du lait** :

- dans une fiole jaugée de 200ml, introduire dans l'ordre :
- 20 ml de lait ;
- 2 ml de solution d'hexacyanoferrate II de potassium à 150 g / l (ferrocyanure de potassium) ;
- 2 ml de solution d'acétate de zinc à 300 g/l ;
- environ 100 ml d'eau distillée ;
- Agiter, puis ajuster à 200 ml ;
- ajouter 2 ml d'eau distillée, agiter et laisser reposer 15 minutes ; filtrer.

· **Oxydation du lactose** : lavage du précipité de Cu_2O .

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 150 ml à col étroit, introduire :

- 20 ml de solution cuivrique (A) ;
- 20 ml de solution tartro-sodique ;
- 10 ml de filtrat de défécation ;
- 10 ml d'eau distillée ;
- agiter. Porter à ébullition douce pendant 3 minutes, laisser reposer, le surnageant doit être bleu ;
- laver le précipité par décantation, à l'eau distillée bouillie et refroidie, en évitant tout contact avec l'air.

*** Réoxydation de Cu_2O et dosage du sel ferreux formé :**

- dissoudre dans la fiole d'Erlenmeyer ou il se trouve, le précipité de Cu_2O par 20 ml de solution ferrique acide ;
- verser cette solution sur le filtrat ;
- rincer à 2 reprises avec 10 ml de solution ferrique acide ;
- faire passer sur le filtre ;
- rincer à l'eau distillée bouillante. Refroidir ;
- titrer par une solution de permanganate de potassium à 0,1 N jusqu'à coloration rose pale, stable 10 à 20 secondes.

*** Expression du résultat :**

Pour ce dosage, on utilise une table de correspondance entre une chute de burette de permanganate 0,1 N(en ml) et la masse de lactose (exprimée en mg de lactose hydraté) dans la prise d'essai (annexe 19).

Annexe 5. Détermination de la teneur en protéines (méthode de LOWRY *et al*, 1951).

Réactifs pour le dosage des protéines :

*** solution alcaline A :**

- soude 0,1 N (2g /500ml)-----500 ml
- carbonate de sodium Na_2CO_3 -----10 g

*** solution cuivrique B :**

- sulfate de cuivre (0,32 g/100ml)-----2 ml
- tartrate de Na et K (1g/100 ml)-----2ml

*** solution C :**

- solution A -----50 ml
- solution B -----1ml

*** Mode opératoire :** 1 ml d'échantillon contenant au maximum 100 μg de protéines et au minimum 25 μg ,

- ajouter 5ml de solution C, mélanger ;
- laisser au repos 10 minutes à T° ambiante ;
- ajouter 0,5ml de réactif de folin Ciocalteu ;
- laisser 30 minutes à l'obscurité et lire la D.O à 750 nm au spectrophotomètre U.V visible contre un blanc.

* **Gamme étalon** : on utilise la BSA pour la courbe d'étalonnage $DO=f(c)$

Concentration µg/ml	0	10	25	50	75	90	100
Solution mère (µl) B.S.A	0	100	250	500	750	900	1000
H ₂ O distillée	1000	900	750	500	250	100	0

Annexe 6. Détermination de la teneur en chlorures (BERTRAND, 1988) :

A. Lait :

* Mode opératoire :

- prélever 20 ml de lait ;
- ajouter 2 ml d'hexacyanoferrate II de potassium à 15% ;
- ajouter 2 ml d'acétate de zinc à 30%, mélanger ;
- remplir d'eau distillée jusqu'au trait de jauge de la fiole, puis ajouter 2 ml pour tenir compte du précipité ;
- filtrer et prendre 100 ml du filtrat ;
- ajouter 5 ml de nitrate d'argent à 0,1 N et 1 ml d'acide nitrique, puis 2 ml d'alun de fer à 38% ;
- titrer à l'aide de thiocyanate de potassium (à 0,1N) jusqu'à coloration rouge brun.

* Résultat :

- la teneur (T) en chlorures du lait exprimée en g de chlorures de sodium par litre de lait est égale à :

$$T=0,00585 (5 - V_1) \times 200/100 \times 100/V_0$$

- la teneur en chlorures du lait exprimée en % en masse de chlorures de sodium est égale à :

$$T=0,00585 (5 - V_1) 200/100 \times 100/E.$$

E : masse en gramme de prise d'essai

V₀ : volume en ml de la prise d'essai

V₁ : volume en ml de la solution de thiocyanate de potassium ou d'ammonium.

B. fromage :

- peser 2 g de fromage puis introduire dans une fiole ;
- ajouter 25 ml de nitrate d'argent à 0,1 (N), puis 25 ml d'acide nitrique (d= 1,4) ;
- chauffer à ébullition jusqu'à coloration jaune citron ;
- ajouter 10 ml de permanganate de potassium à 7,5% ;
- chauffer jusqu'à l'obtention d'un liquide clair ;
- ajouter 5 ml d'alun de fer à 38 %, puis 100 ml d'eau distillée et titrer à l'aide de thiocyanate d'ammonium jusqu'à coloration rouge brique.

* **Résultat :**

$$\text{NaCl} = 25\text{-N} / \text{P} \times 0,585$$

25 : AgNO₃ : nitrate d'argent

N : volume de thiocyanate d'ammonium à 0,1 N

P : prise d'essai.

Annexe 7. Dosage de l'azote (méthode de Kjeldhal) :

A. lait :

* **dosage de l'azote total :**

le dosage est effectué sur 5 ml de lait.

* **dosage d'azote soluble :**

- prendre 20 ml de lait ;
- précipiter à pH 4,6 avec HCl (4 N) ;
- filtrer sur papier filtre ;
- doser l'azote soluble sur 5 ml de filtrat obtenu.

B. fromage :

* **remise en suspension du fromage :**

- prendre 5 g de fromage pesés au mg près ;
- broyer à l'aide d'un mortier et mélanger pour rendre le produit homogène ;
- disperser l'homogénéisât dans une solution de citrate sodique (0,5 M) dans un mixeur pendant 8 minutes ;
- transvaser sans pertes dans une fiole jaugée de 100 ml en rinçant les parois du mixeur ;

- amener le volume à 100 ml avec la solution de citrate de sodium ;

* **Dosage de l'azote soluble :**

- mettre 20 ml de la solution dans un bêcher ;
- amener à pH 4,6 avec HCl (1 N) ;

- transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml ;
- compléter avec de l'eau distillée, agiter et laisser reposer pendant 10 minutes ;
- filtrer sur papier et doser sur 5 ml de filtrat

*** Mode opératoire :**

a : Minéralisation :

- introduire dans un ballon Kjeldhal ou matras :
 - . la prise d'essai (mélanger 10 g de sulfate de cuivre cristallisé et 100 g de sulfate de potassium) ;
 - . 15 à 17 ml d'acide sulfurique concentré ;
 - agiter et placer les matras sur le dispositif de chauffage sous une hotte d'absorption des vapeurs ;
 - augmenter le chauffage jusqu'à douce ébullition du mélange acide ;
- prolonger le chauffage 30 minutes après décoloration du mélange acide ;
- laisser refroidir et boucher pour éviter tout contact avec les vapeurs ammoniacales présentes dans le laboratoire.

B : distillation :

- addition de 30 à 50 ml d'eau distillée tout en rinçant les matras,
- alcaliniser le contenu du matras avec 55 à 65 ml de soude concentrée (20 à 30 ml pour le fromage) et adapter aussitôt à l'appareil de distillation,
- l'allonge du réfrigérant est ajustée de façon à ce qu'elle plonge au fond d'un bêcher dans lequel sont introduits 10 ml de solution d'acide borique avec un indicateur coloré,
- l'entraînement de l'ammoniac commence presque aussitôt et se fait très rapidement et l'indicateur contenu dans le bêcher vire à sa teinte alcaline,
- titrer avec de l'acide sulfurique 0,1 N jusqu'à virage de l'indicateur à sa teinte acide.

*** Résultat :**

- la teneur d'azote total exprimée en gramme d'azote par litre de lait ou par 100 g de fromage est donnée par la relation :

$$T_t = V \times 0,014 \times 200$$

- la teneur d'azote soluble exprimée en gramme d'azote par litre de lait ou par 100 g de fromage est donnée par la relation :

$$T_s = V \times 0,00028 \times 250 \times 0,987$$

Annexe 8. Dosage des groupements a aminés primaires libres dans le fromage par la méthode au TNBS de POLYCHRONIADOU (1988) :

*** Réactifs chimiques :**

- acide 2.4.6 trinitrobenzène-sulfonique (TNBS) de concentration 0,1% (M/V) ;
- tétraborate de Na (0,1 M – Na₂B₄O₇);
- NaOH (0,1 M) ;
- tampon borate (0,1M - Na₂B₄O₇ dans 0,1M-NaOH, pH 9,5) ;
- NaH₂PO₄ (0,1 M) contenant Na₂SO₃ (1,5 mM);
- glycine pure.

*** Mode opératoire :**

- 1 g de fromage est dispersé dans 20 ml du tampon borate pH 9,5 ;
- chauffer à 45 °C pendant 15 minutes, agiter ;
- centrifugation à 3000x g/ 20minutes ;
- réaliser une dilution 1/25 et prendre 1 ml de cette dernière (c'est la solution 1) ;
- à 0,5 ml de la solution 1, ajouter 0,5 ml du tampon borate ;
- ajouter 1 ml du réactif 2.4.6.trinitrobenzène-sulfonique (TNBS) (0,1 % M/m) et agiter ;
- incubation à 37 °C pendant 60 minutes, puis ajouter 2 ml de NaH₂PO₄ (0,1M) ;
- lire la DO à 420 nm.

Les témoins blancs sont préparés avec 0,5 ml d'eau distillée.

(faire 2 à 3 essais pour chaque échantillon).

Annexe 9. Préparation des dilutions :

*** le diluant :**

le diluant utilisé pour préparer les solutions mères est généralement le même que celui qu'on utilise pour effectuer les dilutions décimales. Il ne doit pas induire de variations qualitatives ni quantitatives sur la flore microbienne présente. Il doit aussi assurer la survie de tous les micro-organismes mais ne doit pas favoriser leur multiplication.

Les solutions les plus utilisées en bactériologie alimentaire sont :

- solution tryptone - sel ;
- eau physiologique.

*** dilution du produit à analyser :**

à l'aide d'une pipette de 10 ml, on prélève 9 ml d'eau physiologique que l'on introduit dans une série de 5 tubes stériles pour le lait et pour le fromage.

- **Produit liquide**

On homogénéise convenablement le produit à examiner ou sa suspension à l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1 ml de ce produit.

On introduit aseptiquement le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml de diluant ; ainsi on obtient la dilution 1/10 ou 10^{-1} . On agite manuellement.

A l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1 ml de la dilution 10^{-1} , on l'introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml de diluant ; ainsi on obtient la dilution 1 /100 ou 10^{-2} .

On refait ainsi l'opération jusqu'à l'obtention du nombre de dilutions désiré.

- **Produit solide**

On prélève aseptiquement 1 ml du produit à analyser (fromage) qui a été préalablement dissout dans une solution stérile de citrate de sodium, que l'on introduit dans le premier tube contenant 9 ml d'eau physiologique, on obtient la dilution au 1/10 ou 10^{-1} .

On procède de la même manière que pour le produit liquide jusqu'à obtention de la dilution 10^{-5} ; et on ensemence sur les différents milieux de culture.

Annexe 10. Dénombrement des germes totaux :

A partir des dilutions décimales :

- introduire aseptiquement 1 ml dans les boites de Petri ;
- couler le milieu gélosé fondu au préalable au bain d'eau à ébullition et refroidi à 45°C ; agiter lentement ;
- incuber dans l'étuve à 37°C pendant 72 heures, les boites de pétri retournées ;
- dénombrer les boites contenant des colonies dont le nombre est compris entre 30 et 300 ;
- multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution pour trouver le nombre de germes par millilitre ou par gramme.

Annexe 11. Dénombrement des Streptocoques lactiques :

A partir des dilutions décimales, introduire aseptiquement 1 ml dans les boites de Petri ;

- couler dans chaque boite 14 ml de milieu M 17 fondu et refroidi à 48°C ;
- mélanger et laisser solidifier sur une surface froide ;
- incuber 2 jours à 37°C .

Dans ces conditions, les colonies vont apparaître sous forme lenticulaire ; dénombrer et procéder de la même manière que pour la flore totale pour déterminer le nombre de germes.

Annexe 12. Dénombrement des lactobacilles.

A partir des dilutions décimales, introduire aseptiquement 1 ml dans les boites de pétri,

- couler dans chaque boite 14 ml de milieu MRS fondu et refroidi à 48 °C ;
- mélanger et laisser solidifier sur une surface froide ;
- placer les boites ensemencées dans une jarre pour culture aérobie ;
- incuber 3 jours à 37°C.

Dans ces conditions, les Lactobacilles forment des colonies lenticulaires souvent polylobées de 1 à 3 mm de diamètre. Le calcul du nombre de germes est le même que les précédents.

Annexe 13. Dénombrement de la flore halotolérante :

Dans ce cas, contrairement aux autres germes recherchés, l'ensemencement se fait en surface.

- couler dans chaque boite 14 ml de milieu hypersalé de CHAPMAN préalablement fondu et refroidi à 48 °C ;
- laisser solidifier sur une surface froide en agitant un peu ;
- étaler 0,1 ml d'inoculum à la surface froide en agitant un peu ;
- incuber à 30 °C pendant 48 heures ;
- dénombrer et effectuer le calcul du nombre de germes par millilitre ou par gramme comme précédemment.

Annexe 14 Dénombrement des levures et moisissures :

A partir des dilutions décimales, introduire aseptiquement 1 ml dans les boites de Petri ;

- couler le milieu de l'oxytétracycline OGA préalablement fondu puis refroidi à 45°C ;
- laisser solidifier sur une surface froide en agitant lentement par des mouvements circulaires ;
- incuber à 25 °C pendant 3 à 5 jours ;
- dénombrer les colonies pour chaque espèce. Ne retenir que les boites contenant moins de 150 colonies et les multiplier par l'inverse de la dilution pour avoir le nombre de germes par millilitre ou par gramme.

Annexe 15. Composition des milieux :

*** Gélose nutritive :**

- peptone-----10 g
- extrait de viande-----4 g
- chlorure de sodium-----5 g
- agar-----13 g
- eau distillée-----1000 ml

pH = 7,2

- répartir en flacons de 125 ml
- autoclaver à 115 °C pendant 20 minutes

*** Milieu M17 :**

Milieu de base :

- peptone tryptique de caséine-----2,50 g
- peptone pepsique de viande-----2,50 g
- peptone papainique de soja-----5,00 g
- extrait de levure déshydraté-----2,50 g
- extrait de viande-----5 g
- glycérophosphate de sodium-----19,00 g
- sulfate de magnésium, 7 H₂O-----0,25 g
- acide ascorbique-----0,50 g
- agar-----9 à 18 g
- eau distillée-----950 ml

pH =7,1

- répartir en raison de 95 ml par fiole de 125 ml
- autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes

Solution lactose :

- lactose-----10 g
- eau distillée-----100ml
- autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes

Milieu complet :

- milieu de base préalablement fondu dans un bain d'eau bouillante et refroidi à 48 - 50°C -----95 ml
- solution de lactose-----5 ml
- mélanger par agitation.

*** Milieu MRS (De MAN, ROGOSA, SHARPE)**

- protéose- peptone n° 3-----10 g
- extrait de viande-----10 g
- extrait de levure-----5 g
- glucose-----20 g
- Tween 80 -----1 g
- citrate d'ammonium-----2 g
- sulfate de magnésium, 7 H₂O-----0,1 g
- acétate de sodium , 3 H₂O-----5 g
- sulfate de manganèse, 4 H₂O -----0,05 g
- phosphate dipotassique-----2 g
- agar-----12 g

pH = 5,4

- répartir en flacons de 125 ml à raison de 100 ml
- autoclaver à 125 °C pendant 20minutes

*** Milieu hypersalé de CHAPMAN :**

- extrait de viande de bœuf-----1 g
- peptone-----10 g
- chlorure de sodium-----75 g
- mannitol-----10 g
- rouge de phénol-----0,025 g
- agar-----15 g
- amphotéricine
- eau distillée-----1000 ml

pH=7,4 ± 0,2

- autoclaver 15 minutes à 120°C
- couler en boîte de Petri.

*** Milieu à l'oxytétracycline (OGA)**

- extrait de levure-----5 g
- glucose-----20 g
- gélose-----16 g
- eau distillée-----1000 ml

pH = 7,2 ± 0,2

- répartir en flacons de 250 ml à raison de 100 ml ;

- autoclaver à 115 °C pendant 20 minutes.

Annexe 16. Electrophorèse PAGE –native :

1. Solutions :

*** Solution d'Acrylamide :**

- Acrylamide-----36 g
- Bis - Acrylamide-----1 g
- eau distillée (qsp)-----100 ml

*** Tampon de gel**

- tris-----9,14 g
- eau distillée (qsp)-----100 ml
- ajuster à pH = 8,9 avec HCl (4M)

*** Tampon d'électrodes (une plaque)**

- tris-----0,12 g
- glycine (glycocolle)-----0,58g
- eau distillée (qsp)----- 200 ml
- ajuster à pH = 8,3 avec du tris

*** Préparation du gel : T= 12% ; C= 2,7%.**

- solution d'acrylamide-----3,25ml
 - tampon de gel -----5 ml
 - eau distillée-----1,68 ml
 - dégazage pendant 2 minutes
 - TEMED -----10µl
 - solution de persulfate d'ammonium-----75µl
- à 10 % (P/V)
- couler immédiatement, mettre le peigne.

*** Dépôt d'échantillon :**

- déposer 10 à 20µl d'échantillon dans chaque puit avec une micro-seringue.

Annexe 17. Electrophorèse PAGE –Urée (selon la méthode d'ANDREW 1983) :

*** Gel de séparation : T = 15 % ; C = 4 %**

- Acrylamide-----1,44 g
 - N, N' méthylène - bis – Acrylamide-----0,06 g
 - Urée (4 M) (dans 10 ml du tampon-----2,4 g
- 8,8 du tris)

* **Gel de concentration** : T = 4,81 % ; C= 2,7 %

- Acrylamide-----0,468 g
- Bis – Acrylamide-----0,013 g
- Urée (dans 10 ml du tampon 6,8 -----0,5 g

PAGE-S.D.S)

Immédiatement avant l'utilisation des solutions de concentration et de séparation
ajouter :

- TEMED -----30µl
- persulfate d'ammonium (10 % P/V)-----200 µl

* **Tampon d'électrode** :

- tris -----0,12 g
- glycine -----0,58 g
- eau distillée-----200ml

ajuster le pH avec le tris ; pH = 8,3

- voltage 250 V
- ampérage 25mA.

* **Préparation des échantillons** :

- protéines-----1 mg
- solution d'urée (5,7 M)-----700 µl
- tampon tris (pH 8,9)-----100µl
- glycérol (50 % V/V)-----200 µl
- mettre dans un appendorf
- ajouter 200 µl du 2 mercapto – éthanol.

1. Conditions d'électrophorèse.

- dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl par puit
- voltage : 250 V
- ampérage : 20 mA
- temps : 30 à 45 minutes (PAGE –native)
60 minutes (PAGE – urée)

2. Solution de fixation.

- TCA -----12g
- eau distillée (qsp)-----100ml

3. Solution de coloration.

- bleu de Coomassie R 250-----0,5 g
- eau distillée-----100ml
- méthanol-----100 ml
- T.C.A-----4 g
- temps-----2 heures

4. Solution de décoloration :

- eau distillée-----300ml
- méthanol (99%)-----100 ml
- acide acétique-----10 ml

Annexe 18 . Test de dégustation :

Un test organoleptique est réalisé grâce à un jury composé de sept individus choisis parmi le personnel de l'unité fromagère de DBK.

L'épreuve consiste à noter pour chaque échantillon de fromage, selon l'échelle notée de 0 à 4, l'intensité des caractères (aspect, texture et du goût défini à partir de la dégustation) :

0 : très mauvais ; 1 : mauvais ; 2 : moyen ; 3 : bon ; 4 : très bon.

Les quatre fromages (FLL et FLM affinés jusqu'aux stades J+12 et J+20) et les deux autres soumis à l'entreposage réfrigéré (6-10°C) pendant une semaine, sont présentés en même temps et déposés dans un ordre aléatoire. Les dégustateurs doivent individuellement évaluer chaque fromage selon les caractères prédéfinis. Lorsqu'ils passent d'un échantillon à un autre, ils doivent se rincer la bouche avec de l'eau afin d'effacer le goût de l'échantillon précédent.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Fromage Critères	FLL			FLM		
	J+12	J+20	Jer+7	J+12	J+20	Jer+7
Aspect	3	3	1	2	3	2
Texture	3	4	2	4	4	3
Goût	3	4	2	3	3	3

Annexe 19 : Dosage du lactose (Technique de BERTRAND) : Quantité de lactose hydraté, exprimé en milligramme, en fonction du volume de la solution (0,1N) de permanganate de potassium.

KMnO₄ 1,1N	Lactose hydraté	KMnO₄ 1,1N	Lactose Hydraté	KMnO₄ 1,1N	Lactose Hydraté
5,0	23,6	8,5	41,0	12,0	58,9
5,1	24,1	8,6	41,5	12,1	59,9
5,2	24,6	8,7	42,0	12,2	60,0
5,3	25,1	8,8	42,5	12,3	60,5
5,4	25,6	8,9	43,0	12,4	61,0
5,5	26,1	9,0	43,5	12,5	61,5
5,6	26,6	9,1	44,0	12,6	62,1
5,7	27,1	9,2	44,5	12,7	62,6
5,8	27,6	9,3	45,0	12,8	63,1
5,9	28,0	9,4	45,5	12,9	63,3
6,0	28,6	9,5	46,0	13,0	64,1
6,1	29,0	9,6	46,5	13,1	64,7
6,2	29,5	9,7	47,1	13,2	65,2
6,3	30,0	9,8	47,6	13,3	65,7
6,4	30,5	9,9	48,1	13,4	66,2
6,5	31,1	10,0	48,6	13,5	66,8
6,6	31,6	10,1	49,1	13,6	67,3
6,7	32,0	10,2	49,6	13,7	67,8
6,8	32,5	10,3	50,1	13,8	68,4
6,9	33,0	10,4	50,6	13,9	68,9
7,0	33,5	10,5	51,2	14,0	69,4
7,1	34,0	10,6	51,2	14,1	69,9
7,2	34,5	10,7	51,7	14,2	70,0
7,3	35,0	10,8	52,2	14,3	71,0
7,4	35,5	10,9	52,7	14,4	71,5
7,5	36,0	11,0	53,7	14,5	72,5
7,6	36,5	11,1	54,2	14,6	72,6
7,7	37,0	11,2	54,8	14,6	72,6
7,8	37,5	11,3	55,3	14,7	73,1
7,9	38,0	11,4	55,8	14,8	73,6
8,0	38,5	11,5	56,3	14,9	74,1
8,1	39,0	11,6	56,8	15,0	74,7
8,2	39,0	11,7	57,4		
8,3	40,0	11,8	57,9		
8,4	40,5	11,9	58,4		

RESUME

Dans le but d'apprécier les aptitudes à la transformation en produit dérivé du mélange (lait frais / lait recombinaé) utilisé dans notre pays comme palliatif au déficit de la production en lait cru, nous avons réalisé des essais de fabrication du fromage à pâte molle type *Camembert* à la Laiterie de Draa Ben Khedda en nous intéressant particulièrement à l'évaluation de l'activité protéolytique se déroulant au cours de la phase d'affinage et de l'entreposage réfrigéré de ce fromage. Cette activité est mesurée par le dosage des groupements aminés libérés (méthode utilisant un réactif spécifique : le TNBS) et par le suivi du comportement électrophorétique des caséines en PAGE-urée. L'impact du traitement de pasteurisation (85°C / 20 sec) sur le lait de départ et la nature de ce dernier ont été aussi examinés.

Les analyses réalisées ont montré que le lait mixte (mélanges à parts égales entre le lait frais et le lait recombinaé) permet, en corrigeant le taux protéique faible du lait cru collecté localement, d'améliorer sa valeur nutritionnelle et ses aptitudes technologiques. Néanmoins, les profils des protéines sériques en PAGE-native ainsi que le dosage des protéines solubles après le traitement de pasteurisation ont révélé un fort taux de dénaturation induit par ce dernier et estimé à environ 30% dans le cas du lait recombinaé utilisé seul.

Concernant l'appréciation de la phase d'affinage où l'évaluation de l'activité protéolytique est corrélée au développement des micro-organismes, tant au niveau de la croûte superficielle qu'en profondeur du produit dérivé, les résultats obtenus ont montré que pour les deux types de fromages considérés (à base de lait frais uniquement ou du lait mixte), la protéolyse est plus prononcée en surface qu'à l'intérieure du *Camembert* et ce quelque soit la durée d'affinage considérée. Cette activité, qui est prépondérante après le sixième jours d'affinage, demeure incomplète après 12 jours (temps de maturation pratiqué à l'unité). Le prolongement de la durée d'affinage à 15 et 20 jours a d'ailleurs mis en relief cette insuffisance. En outre, l'entreposage réfrigérée ne semble pas être une voie appropriée pour l'expression des caractéristiques organoleptiques recherchées du *Camembert*.

Mots clés : Lait / fromage / *Camembert* / protéolyse / électrophorèse / TNBS / affinage / Pasteurisation / valeur nutritionnelle / qualité .

SUMMARY

In the goal to appreciate faculties to the transformation produces some derivative of the mixture (cool milk / recombined milk) used in our country as palliative to the deficit of the production in raw milk, we achieved tests of cheese manufacture to dough soft *Camembert* type in the Dairy of Draa Ben Khedda while especially interesting us to the assessment of proteolytic activity taking place during the phase of refinement and the storage refrigerated of this cheese. This activity is measured by the free amino grouping dosage (method using a specific reactif: the TNBS) and by the follow-up of casein behaviour electrophoretic in Page - Urea.

The impact of the pasteurization treatment (85°C during 20 dry) on the milk of departure and the nature of this last have been examined also.

The achieved analyses showed that the mixed milk (mixture to equal parts between the cool milk and milk recombined) permits, while correcting the rate weak proteic of the raw milk collected locally, to improve its value nutritional and its technological faculties. Nevertheless, electrophoretic pattern's of seriqueses proteins in Page - Native as well as the soluble protein dosage after the treatment of pasteurization revealed a strong induced denaturation rate by this last and valued to about 30% in the case of milk recombined used only.

Concerning tea appreciation of tea refinement phase, however tea assessment of proteolytic activity is combined to tea development of microorganisms, so much at tea level of tea superficial crust that in depth of tea derivative product tea gotten results showed that for tea two types of cheese considered (milk-based expenses solely however of tea mixed milk), tea proteolysis is pronounced more in surface that inside tea *Camembert* and this some either tea length of refinement considered. This activity, that is major after the sixth day of refinement, incomplete home after 12 days (time of maturation exercised to the unit. The extension of the refinement length at 15 and 210 days put besides in relief this insufficiency. Besides, the refrigerated storage doesn't seem to be a way appropriated for the characteristic organoleptiques expression searched for of the *Camembert*.

Key words : milk / cheese/ *Camembert* / proteolysis / electrophoresis / TNBS / refinement / pasteurization / nutritionnelle worth / quality.