

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires
(I.N.A.T.A.A.)

N° d'ordre :
N° de série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires
Option : biochimie et technologie alimentaire

Thème

Contribution à la caractérisation du fromage *Bouhezza*: Contenu lipidique et vitamines

Présenté par : M. BELBELDI Abdessalem

Devant le jury :

Président : <i>Dr.</i> BOUDJELLAL A.	Maître de Conférences	INATAA-UC1
Rapporteur : <i>Pr.</i> ZIDOUNE M.N.	Professeur	INATAA-UC1
Co-rapporteuse : <i>Dr.</i> BENATALLAH L.	Maître de Conférences	INATAA-UC1
Examinatrice : <i>Pr.</i> BARKAT M.	Professeur	INATAA-UC1
Examinatrice: <i>Dr.</i> AMOURACHE L.	Maître de Conférences	INATAA-UC1

Année universitaire : 2012-2013.

Résumé

Bouhezza est un fromage traditionnel Algérien, fabriqué et consommé dans la région *Chaouia* au Nord-est du pays. Il est fabriqué avec du lait cru de vache, chèvre, brebis ou de leur mélange. Ainsi, sa fabrication exige la préparation d'un sac en peau animale entière de chèvre ou de brebis (*Chekoua*). Les différentes étapes de la fromagerie de *Bouhezza* y a compris l'affinage, qui dure quatre à dix semaines, se réalisent à l'intérieur de la *Chekoua*. En vue de contribuer à la caractérisation du *Bouhezza*, l'objectif principal de ce travail est d'étudier la fraction lipidique globale du fromage traditionnel affiné.

Six différents échantillons de fromage *Bouhezza* collectés de six fermes familiales localisées dans la région rurale de la wilaya d'Oum El Bouaghi ont été étudiés. Les fromages ont été affinés dans la *Chekoua* pendant 30 jours, et seulement trois échantillons sont épicés avec la poudre de piment rouge. La caractérisation des fromages a concerné les paramètres physicochimiques (pH, acidité, matière sèche, teneur en sel, taux de matière grasse, azote total et protéines solubles à pH 4.6), les acides gras insaturés (acide linoléique, acide linoléique et les acides linoléiques conjugués (ALC)), ainsi que la teneur en vitamines liposolubles (β -carotène et α -tocophérol).

Les résultats montrent que les fromages collectés ont une teneur en extrait sec total de 26.08 ± 1.65 g par cent grammes de fromage et une teneur en matière grasse de 33.69 ± 5.19 g par cent grammes de matière sèche. Un pH de 3.92 ± 0.19 et une acidité de 5.27 ± 0.48 g d'acide lactique par cent grammes de matière sèche. Le taux de maturation (NS/NT) est de $9.5 \pm 3.24\%$.

Le contenu en acide linoléique, acide linoléique et acides linoléiques conjugués référé à 100g de *Bouhezza* est compris entre 145.7 à 1184.8 mg, 69.9 à 276.8 mg et 6.0 à 11.5 mg respectivement. La variation de la concentration de ces acides gras insaturés dans les échantillons peut être expliquée par leur composition et leur teneur en matière grasse.

La teneur des fromages en vitamines liposolubles (β -carotène et en α -tocophérol) varie respectivement de 0.03 à 0.2mg/100g et 0.1 à 0.5 mg/100g. Les échantillons épicés ont les teneurs les plus élevées en β -carotène.

Mots clés : *Bouhezza*, fromage traditionnel, acides linoléiques conjugués, β -carotène, α -tocophérol, acide linoléique, acide linoléique.

Abstract

Bouhezza is an Algerian traditional cheese, manufactured and consumed in the *Chaouia* area in the North-East of the country. It is manufactured with milk of cow, goat, ewe or by their mixture. Thus, its manufacture requires the preparation of a bag with the whole animal skin of goat or ewe (*Chekoua*). The various stages of manufacture included the aging that take four to ten weeks are carried inside *Chekoua*. In order to contribute to the characterization of *Bouhezza*, the principal objective of this work is to study the total lipidic fraction of the ripened traditional cheese.

Six various samples *Bouhezza* cheese collected from six family farms localized in the rural area of the wilaya of Oum El Bouaghi were studied. The cheeses were ripened inside *Chakoua* during 30 days, and only three are spiced with the hot red pepper powder. The characterization of cheeses related to the physico-chemical parameters (pH, acidity, dry matter, salt, fat, total nitrogen and soluble proteins in pH 4.6), the unsaturated fatty acids (acid linoleic, acid linolenic and conjugated linoleic acids (CLA)), moreover the content of liposoluble vitamins (β -carotene and α -tocopherol).

The results show that the collected cheeses have a dry matter of 26.08 ± 1.65 g per one hundred grams of cheese and a fat content of 33.69 ± 5.19 g per one hundred grams of dry matter. The pH is 3.92 ± 0.19 and the acidity is 5.27 ± 0.48 g of lactic acid per one hundred grams of dry matter. The rate of maturation (SN/TN) is $9.5 \pm 3.24\%$.

The contents in linoleic acid, linolenic acid and conjugated linoleic acids referred to 100g of *Bouhezza* are between 145.7 to 1184.8 mg, 69.9 to 276.8 mg and 6.0 to 11.5 mg respectively. The variation of the concentration of these unsaturated fatty acids in the samples can be explained by their composition and their fat content.

The cheeses liposoluble vitamins content (β -carotene and α -tocopherol) varies respectively from 0.03 to 0.2mg/100g and from 0.1 to 0.5 mg/100g. The spiced samples have the highest β -carotene content.

Keywords: *Bouhezza*, traditional cheese, conjugated linoleic acids, β -carotene, α -tocopherol, linoleic acid, linolenic acid.

ملخص

بوهزة هو جبن تقليدي جزائري, يحضر و يستهلك في منطقة الشاوية شمال شرق البلاد, هذا الجبن يحضر من حليب البقر, المعز, النعاج أو من مزيجهم, تحضيره يتطلب إعداد وعاء بجلد الماعز أو الخراف (الشكوة). إن مختلف مراحل التحضير بما في ذلك مرحلة النضج التي تدوم من أربعة إلى عشرة أسابيع تتحقق داخل الشكوة. من أجل المساهمة في تمييز البوهزة , يهدف هذا العمل إلى دراسة مجمل القسمة الدهنية للجبن التقليدي الناضج.

تمت دراسة ستة عينات مختلفة من البوهزة مأخوذة من ستة مزارع عائلية متموقعة في المنطقة الريفية لولاية أم البواقي. تم إنضاج الأجبان داخل الشكوة لمدة ثلاثين يوما, ثلاثة منها فقط متبلة بطحين الفلفل الأحمر. إن تمييز الأجبان يشمل المعايير الفيزيائية الكماوية (pH , المادة الجافة, الحموضة, نسبة الملح, نسبة المادة الدسمة, النيتروجين الكلي و البروتينات السائلة في 4.6 pH), الأحماض الدهنية الغير مشبعة (Acide linoléique, acide linoléique و acides linoléiques conjugués (الأحماض الدهنية التزاوجة). بالإضافة إلى الفيتامينات التي تذوب في الدهن (α -tocophérol و β -carotène).

تظهر النتائج أن نسبة المستخلص الكلي الجاف للأجبان المجموعة تقدر ب 1.65 ± 26.08 غرام من مائة غرام من الجبن ونسبة المادة الدسمة تقدر ب 5.19 ± 33.69 غرام من مائة غرام من المادة الجافة. قيمة pH تقدر ب 0.19 ± 3.92 و الحموضة ب 0.48 ± 5.27 غرام من حمض اللبن من مائة غرام من المادة الجافة. إن نسبة النضج في حدود 3.24 ± 9.5 بالمائة.

المحتوى من acide linoléique , acide linoléique و acides linoléiques conjugués منسوب إلى 100 غرام من البوهزة محصور بين 145.7 و 1184.8 ملي غرام , 69.9 و 276.8 ملي غرام و 6.0 و 11.5 ملي غرام على التسلسل. إن التغيير في تراكيز هذه الأحماض الدهنية في العينات قد يفسر بتركيباتهم و نسبة مادتهم الدهنية.

إن نسبة الفيتامينات التي تذوب في الدهن (α -tocophérol و β -carotène) تتغير على التسلسل من 0.03 إلى 0.2 ملي غرام /100 غرام و من 0.1 و 0.5 ملي غرام /100 غرام. العينات المتبلة كان لها المحتوى الأكبر من β -carotène.

الكلمات الدالة: بوهزة, جبن تقليدي, acides linoléiques conjugués , β -carotène , α -tocophérol

acide linoléique ,acide linoléique

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, le Tout Puissant et le Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ma formation de magister.

Mes vifs remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Monsieur le professeur ZIDOUNE M.N pour avoir dirigé ce travail avec une efficacité et rigueur scientifiques qui lui sont propres. Pour sa disponibilité et la patience qu'il a eu à notre égard.

Madame BENATALLAH L., Maitre de conférences à l'I.N.A.T.A.A pour sa grande contribution à l'avancement de ce travail.

Monsieur Dr. BOUDJELLAL A., Maitre de conférences et directeur de l'I.N.A.T.A.A., d'avoir accepté la présidence de jury, par ses conseils éclairés il ne fera qu'enrichir cette étude.

Madame le professeur BARKAT M., pour avoir accepté de faire partie du jury, par ses conseils et remarques elle contribuera à améliorer la qualité de ce travail.

Mademoiselle Dr. AMOURACHE L., Maitre de conférences à l'I.N.A.T.A.A pour sa participation à l'évaluation de ce travail, ses remarques ne feront qu'apporter un plus à ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude spéciale à Madame AISSAOUI ZITOUN O., et Madame BOUGHALLOTH.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à tous les personnels de CoRFiLaC et spécialement Stefania CARPINO, Vita Maria Marino, Giovanni FARINA et Glenda LETO.

Enfin, je voudrais remercier toute personne a contribué de loin ou de proche à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1-Composition générale du lait.....4

2-Fromage4

2-1 Définition 4

2-2 Technologie des fromages 5

2-3 Classification des fromages 9

3- Fromage *Bouhezza* 10

3-1 L'ben 10

3-2 Préparation de la *Chekoua* 10

3-3 Fabrication de *Bouhezza*..... 11

4- Fraction lipidique des fromages 13

4-1 Isomères conjugués de l'acide linoléique..... 14

4-1-1 Origine des acides linoléiques conjugués..... 15

4-1-2 Propriétés physiologiques des acides linoléiques conjugués..... 17

4-1-3 Métabolisme des acides linoléiques conjugués 18

4-1-4 Acides linoléiques conjugués et composition corporelle 19

4-1-5 Acides linoléiques conjugués et pathologies 19

4-1-5-1 Acides linoléiques conjugués et cancer..... 19

4-1-5-2 Acides linoléiques conjugués et réponse immunitaire 21

4-1-5-3 Acides linoléiques conjugués et facteurs de risque cardio-vasculaire 21

4-2 β -carotène et α -tocophérol dans les fromages 22

4-2-1 β -carotène 23

4-2-2 α -tocophérol..... 24

5- Aperçu sur les techniques chromatographiques utilisés..... 25

5-1 Principe général de la chromatographie liquide haute performance..... 25

5-2 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse 26

5-3 Chromatographie liquide haute performance Ion Argent.....	27
---	----

PARTIE EXPERIMENTALE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1-Echantillons de fromage	29
2-Diagramme de fabrication	31
3-Caractérisation physicochimique	32
3-1 Détermination du pH et de l'acidité	32
3-2 Matière sèche	33
2-3 Détermination de la teneur en sel (NaCl) dans le fromage	33
3-4 Dosage de taux de matière grasse	35
2-5 Dosage de l'azote total	36
2-6 Protéines solubles à pH 4.6	37
4- Caractérisation du contenu lipidique.....	37
4-1 Evaluation du contenu en acide gras	38
4-1-1 Extraction des acides gras y compris les isomères de l'acide linoléique conjugué (ALC)	38
4-1-2 Saponification	39
4-1-3 Description du système HPLC utilisé	41
4-1-4 Séparation des acides gras polyinsaturés non conjugués	43
4-1-5 Séparation des acides linoléiques conjugués	43
4-2 Evaluation du contenu en vitamines liposolubles.....	44
4-2-1 Extraction de la vitamine E et du β -carotène.....	44
4-2-2 Séparation par l'HPLC	45

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1- Caractéristiques physico-chimiques du fromage <i>Bouhezza</i>.....	46
1-1 pH et acidité titrable	46
1-2 Matière grasse	47
1-3 Extrait sec total	47
1-4 Taux de sel (NaCl)	48
1-5 Taux d'azote et ces fractions	48

2- Caractéristiques de la fraction lipidique du <i>Bouhezza</i>	51
2-1 Contenu en acide gras polyinsaturés	51
2-1-1 Acide linoléique et acide linoléique	51
2-1-2 Acides linoléique conjugués (ALC).....	53
2-2 Contenu en vitamines liposolubles	55
Conclusion	58
Références bibliographiques.....	60
Annexes	

Liste des figures

Figure 1. Aperçu général des réactions biochimiques pendant l'affinage des fromages.....	8
Figure 2. Biohydrogénation ruminale, absorption, et transformation tissulaire des acides linoléique et linoléinique, et de leurs dérivés	16
Figure 3. Structures chimiques d'acide linoléique ordinaire et les deux principaux acides linoléiques conjugués (<i>cis-9, trans-11</i> et <i>trans-10, cis-12</i>)	18
Figure 4. Structure chimique de la β -carotène : <i>trans</i> - β -carotène, 9- <i>cis</i> - β -carotène, 13- <i>cis</i> - β -carotène et 15- <i>cis</i> β -carotène.....	24
Figure 5. Schéma d'un système HPLC.....	26
Figure 6. Model de DEWAR de l'interaction de l'ion argent avec la double liaison oléfinique	28
Figure 7. Méthodes utilisées pour l'évaluation du contenu en acides gras dans les échantillons de <i>Bouhezza</i>	38
Figure 8. Vue de face du module de séparation Waters 2695.....	41
Figure 9. Circuit fluidique dans le système de gestion des solvants	42
Figure 10. Circuit fluidique à travers le système de gestion des échantillons	42
Figure 11. Moyenne du contenu en β -carotène dans les échantillons de Bouhezza épice (BE) et sans épice (BSE).....	56

Liste des tableaux

Tableau 1. : Classification des fromages selon la norme CODEX STAN A-6. (1978).....	9
Tableau 2. Composition moyenne en isomères de position et géométrique d'acide linoléique conjugué (% d'isomères totaux) du lait, beurre et fromage	15
Tableau 3. Echantillons de fromage <i>Bouhezza</i>	30
Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de <i>Bouhezza</i>	46
Tableau 5. Fractions azotés des échantillons de <i>Bouhezza</i>	49
Tableau 6. Contenu en acide linoléique et linoléique dans le fromage <i>Bouhezza</i>	51
Tableau 7. Contenu en isomères d'Acide Linoléique Conjugué dans le fromage <i>Bouhezza</i> (% des ALC totaux)	53
Tableau 8. Contenu en isomères d'Acide Linoléique Conjugué dans le fromage <i>Bouhezza</i> ($\mu\text{g/g}$ matière grasse)	54
Tableau 9. Contenu en α -tocophérol et β -carotène dans le fromage <i>Bouhezza</i>	55

Liste des abréviations

ADN : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique

ALC ou **CLA** : Acides Linoléiques Conjugués

C20, C22 : Nombre d'atomes de carbone constituant la molécule

cm : Centimètre

CPG : Chromatographie **P**hase **G**azeuse

IMC : Indice **d**e **M**asse **C**orporelle

kg : kilogramme

M : **M**olarité

Met : Méthionine

mg : milligramme

MGES : Taux de **M**atière **G**rasse dans l'**E**xtrait **S**ec

mm : millimètre

N : **N**ormalité

p/v : poids/volume

pH : potentiel d'**H**ydrogène

Phe : Phénylalanine

rpm: rotation **p**ar **m**inute

TEFD : Teneur en **E**au dans le **F**romage **D**égraissé

UV : **U**ltra**V**iolet

v/v : volume/ volume

LDL: **L**ow-**D**ensity **L**ipoprotein

HDL: **H**igh-**D**ensity **L**ipoprotein

µg: **M**icrogramme

FAO: **F**ood and **A**griculture **O**rganization

OMS: **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

Introduction

Introduction

La plupart des cultures à travers le monde connaissent le fromage depuis des temps immémoriaux. Il s'agissait principalement d'une forme concentrée du lait qui avait l'avantage d'avoir une durée de conservation prolongée. Historiquement, plusieurs écritures indiquent que le fromage est apparu en même temps que l'élevage, à l'époque néolithique, où des sacs faits de l'estomac de certains animaux, étaient alors utilisés pour transporter le lait. Chaque type de fromage est entouré par un savoir-faire ancestral transmis d'une génération à l'autre jusqu'à nos jours, où nous observons qu'un certain nombre de fromages a fait la transition de l'échelle traditionnelle à l'industrielle, mais il reste beaucoup d'entre eux qui ont gardé leur authenticité et sont fabriqués et consommés dans des zones géographiques restreintes.

En Algérie, les fromages traditionnels sont peu nombreux, non entièrement recensés et aussi peu étudiés, environ dix types de fromages sont connus dans différentes régions du pays (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011). Les fromages *Bouhezza*, *Mechouna* et *Madeghissa* sont fabriqués dans la région des *Chaouia* (Nord-est), *Takammèrite* et *Aoules* dans le sud, *Igounanes* dans la région de *Kabylie* (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011), *Klila* et *Djben* sont connus dans plus d'une région (HALLEL, 2001). Ces fromages restent encore non labellisés, leur fabrication est destinée à l'autoconsommation au niveau familial. Certains d'entre eux sont plus ou moins commercialisés d'une manière artisanale. Le fromage *Bouhezza* semble être le seul fromage traditionnel affiné (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011). Son procédé de fabrication est caractérisé par l'occurrence simultanée de la coagulation spontanée, salage, égouttage et les opérations de maturation dans un sac naturel perméable de peau animale appelée « *Chekoua* ». Dans le bassin méditerranéen et l'Europe orientale, il existe plusieurs types de fromages affinés dans le sac de peau animale tel que le fromage *Tulum* fabriqués en Turquie (HAYALOGLU *et al.*, 2007 ; ONER *et al.*, 2004 ; CAKMAKCI *et al.*, 2008), le *Darfiyeh* fabriqué en Liban (SERHAN *et al.*, 2008 ; SERHAN *et al.*, 2010) et plusieurs fromages fabriqués à Croatie, Bosnie, Herzégovine et Monténégro (KALIT *et al.*, 2010).

Vue sa richesse en protéines et en lipides et ses différentes caractéristiques sensorielles, il est devenu un aliment nutritif très apprécié. Ces dernières décennies, plusieurs chercheurs en

nutritions ont mis en évidence la contribution du fromage dans l'alimentation et la santé (WALTHER *et al.*, 2008).

Les acides linoléiques conjugués ALC ou CLA (conjugated linoleic acid) est le terme collectif employé pour décrire les isomères géométriques et positionnels de l'acide linoléique (C18 :2 *cis*-9, *cis*12) dont les deux doubles liaisons sont conjuguées (HA *et al.*, 1987). Connus depuis les années 30, les ALC n'ont attiré que récemment l'attention des scientifiques pour leurs propriétés physiologiques potentiellement intéressantes pour la santé : réduction de cancers chimio-induits chez l'animal, effets immunitaires, impact potentiel sur la cholestérolémie et l'athérogenèse, action sur la répartition de la masse grasse corporelle, implication dans la prévention et le traitement du diabète de type 2, influence sur les composantes du syndrome métabolique...etc. (LEDOUX, 2006). Par conséquent, la détermination de la distribution des isomères d'ALC dans les produits laitiers, qui sont leur source principale naturelle dans l'alimentation, est une question appropriée pour la santé humaine (NUNES J.C et TORRES A.G., 2010).

Dans l'optique de sauvegarder la tradition du *Bouhezza*, plusieurs études scientifiques en vue de sa caractérisation ont été réalisées au sein du Laboratoire Nutrition et Technologie Alimentaire (LNTA-INATAA). Depuis une dizaine d'années, des enquêtes sur terrain, des études physicochimiques et microbiologiques, sensorielles et rhéologiques ont été réalisées. La présente étude s'inscrit dans la même démarche. Elle projette la lumière sur une partie de la fraction lipidique de ce fromage, en évaluant son contenu en acides gras essentiels. Il s'agit de l'acide linoléique (oméga 6), α -linoléique (oméga 3) et les acides linoléiques conjugués (ALC). De plus, l'évaluation de la concentration en antioxydants: le β -carotène et de l' α -tocophérol a été réalisée. Ce travail a été mené au sein du Consortium pour la Recherche en Filière Laitière et Fromagère (Consortio per la Ricerca sulla Filiera Lattiero Casearia-Raguse (CoRFiLaC) de la Région de Sicile, Italie dans le cadre de l'accord programme APQ (Accordo di Programma Quadro Medeterania-Algeria), programme d'appui à la coopération régionale "Développement de la Filière Laitière et Fromagère en Algérie ».

De ce fait le manuscrit présenté comporte une partie bibliographique sur le lait, la fromagerie, le fromage traditionnel *Bouhezza*, la fraction lipidique des fromages et un aperçu sur

les techniques chromatographiques. La bibliographie est suivie par une deuxième partie décrivant les échantillons de fromage, la méthodologie adoptée et les techniques expérimentales d'analyse. En dernier, le manuscrit comporte la partie Résultats et Discussion.

Cette étude a déjà donné lieu à la publication suivante :

MARINO V.M., BELBELDI A., LaTERRA S., MANENTI M., LICITRA G and CARPINO S. 2012. A survey of fat-soluble antioxidants, linolenic acid and conjugated linoleic acid content of traditional Algerian Bouhezza cheese. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.10 (3&4) : 186-190.

Revue

bibliographique

1- Composition générale du lait

Le lait contient les nutriments requis pour la croissance et le développement du nourrisson, et est une ressource en lipides, protéines, acides aminés, vitamines et sels minéraux. Il contient des immunoglobulines, des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines, des nucléotides, des peptides, des polyamines, des enzymes et d'autres peptides bioactive. Tous ces composants font que le lait est une denrée alimentaire possédant des propriétés nutritives très importantes.

Dans le lait, Les protéines sont en dispersion colloïdale sous forme de micelles. Les micelles de caséine se produisent en tant que complexes colloïdaux de protéine et de sels, principalement le calcium (KEENAN et PATTON, 1995). Les lipides sont émulsionnés dans des globules gras. Le lactose et la plupart des sels minéraux sont en solution. La composition du lait a une nature dynamique, et la composition change avec le stade de la lactation, l'âge, la race, l'alimentation, le bilan énergétique et de l'état de santé de la mamelle.

Le changement de la composition du lait pendant toute la période de lactation semble assortir au besoin changeant au cours de la croissance infantile, donnant différentes quantités de composants importants pour l'apport nutritif, défense spécifique et non spécifique, croissance et développement. Les protéines spécifiques du lait sont impliquées dans le développement précoce de l'immuno-réaction, tandis que d'autres participent à la défense non-immunologique (JENSEN et NEWBURG, 1995). Les Colostrums (lait des premières lactations) diffèrent considérablement au lait normal ; la différence la plus significative est la concentration en protéine qui peut être environ le double en colostrum comparé au lait des lactations normales (ONTSOUKA *et al.*, 2003).

2- Fromages

2-1 Définition

Les fromages sont des formes de conservation et de stockage ancestrales de la matière utile du lait dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont très appréciées (JEANTET *et al.*, 2008). A l'échelle mondiale, il existe environ 1000 variétés de fromages différents (IRLINGER et MOUNIER, 2009).

Selon le Codex alimentarius, (norme FAO/OMS A 6), le fromage est le produit solide ou semi-solide, frais ou affiné, dont le ratio lactosérum/caséine n'est pas supérieur à celui du lait, et qui est obtenu :

a- par coagulation (totale ou partielle) des matières premières suivantes : lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème, crème de lactosérum ou babeurre, sous l'action de la présure ou d'un autre coagulant approprié, et par égouttage partiel du lactosérum issu de cette coagulation, ou

b- par des techniques de transformation comprenant la coagulation du lait et/ou de matières issues du lait, qui donnent un produit fini possédant les mêmes propriétés physiques, chimiques et organoleptiques que le produit répertorié dans la classification des fromages.

Le fromage mûri ou affiné est un fromage qui ne peut être consommé peu après sa fabrication. Il doit être conservé pendant un temps défini, à la température et dans les conditions particulières qui induiront les transformations biochimiques et physiques spécifiques du type de fromage. Le fromage mûri ou affiné aux moisissures est un fromage affiné dont la maturation est due essentiellement au développement de moisissures caractéristiques internes et/ou externes. Le fromage non mûri, non affiné ou frais est un fromage prêt à être consommé peu après sa fabrication.

2-2 Technologie des fromages

Selon BRULE *et al.* (1997), la transformation du lait en fromage comporte quatre étapes principales, ces dernières peuvent être précédés par une opération de standardisation du lait, qui comprend l'ajustement du pH d'emprésurage pour faciliter la coagulation du lait, l'ajout de minéraux, la réduction de la teneur en lactose, l'ajustement de la teneur en matière grasse et ou en protéines (VIGNOLA C, 2002), parce que les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagères, ils présentent un certain nombre de caractéristiques différentes qui conditionnent leur aptitude à la déstabilisation, nécessaire pour passer de l'état liquide à l'état solide ainsi que les propriétés des coagulums (JEANTET *et al.*, 2006).

➤ La coagulation : modification physico-chimique des micelles de caséines, entraînant la transformation du lait en gel (ECK et GILLIS, 1997). Elle est liée étroitement à la déstabilisation structurale de la micelle de caséine et peut s'effectuer par voie acide ou par voie enzymatique (GELAIS *et al.*, 2002).

- La coagulation par voie acide : où l'acidification du lait peut être obtenue par l'ensemencement de bactéries lactiques ou par l'ajout d'acide. L'acidification lente est réalisée par des bactéries lactiques (CAYOT et LORIENT, 1998) qui transforment le lactose en acide lactique (VIGNOLA, 2002). L'acidification rapide est réalisée par l'addition de l'acide minéral ou organique, qui provoque la floculation des caséines à pH = 4.6 et la formation d'un gel plus ou moins granuleux dispersé dans lactosérum (ECK et GILLIS, 1997). Le gel lactique obtenu est fiable, fragile, perméable et peu contractile, sa structure protéique au microscope est plus dispersée et moins liée (VEISSEYRE, 1979).

- La coagulation par voie enzymatique : Il existe un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne qui ont la propriété de coaguler le lait. Dans ce contexte, la présure (mélange de chymosine et de pepsine secrété dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait) est l'enzyme coagulante la mieux connue (ECK et GILLIS, 1997), son mécanisme d'action est assez bien établi et comporte 02 phases (VINGNOLA, 2002).

- La phase primaire (enzymatique) où la présure attaque la liaison Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ de la caséine- κ , en libérant un peptide (caséinomacropéptide) et par conséquent, la déstabilisation de la micelle de caséine (HORNE, 2002).

- La phase secondaire (coagulation), où les micelles modifiées s'associent entre elles en présence de calcium pour former un gel (BRULE *et al.*, 1997).

Le gel présure est souple, élastique, cohérent, imperméable et contractile (VEISSEYRE, 1979).

- La coagulation mixte : résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification, la multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibre spécifique est à l'origine de la grande diversité des fromages à pates pressée non cuite (JEANTET *et al.*, 2006).

➤ L'égouttage est une opération de déshydratation partielle du caillé, assurée par l'élimination d'une partie de lactosérum. Ce processus dépend des facteurs directs (traitements mécaniques et thermiques), indirects (acidification et/ou coagulation enzymatique) et de la qualité de la matière première (richesse en caséines, en protéines solubles et en matière grasse (VEISSEYRE, 1979 ; RAMET, 1987). Le caillé obtenu par voie acide possède des propriétés rhéologiques et une aptitude à l'égouttage opposée à celles du gel issu d'une action enzymatique dominante (LEJAOUEN, 1977 ; VEISSEYRE, 1979), le

premier caillé est très friable, son égouttage est spontané, tandis que, l'égouttage du caillé présure nécessite un travail mécanique car il est très souple et imperméable.

➤ Pour la plupart des fromages, une opération de salage entre l'égouttage et l'affinage est indispensable, cette phase consiste à enrichir la pâte fromagère en chlorure de sodium (VEISSEYRE, 1979). Pour cela, plusieurs techniques sont envisagées : incorporation de sel par dépôt en surface ou dans la masse, ou par immersion en saumure (ECK et GILLIS, 1997 ; FOX et KELLY, 2006). Par son action sur l'activité d'eau, le salage complète l'égouttage et joue un rôle important au cours de l'affinage des fromages.

➤ L'affinage est la transformation biochimique (figure 1) des constituants du caillé sous l'action d'enzymes, pour la plupart d'origine microbienne (ECK, 1987). A l'exception des fromages frais, tous les autres types de fromages subissent une maturation biologique plus ou moins prononcée, destinée à développer leur saveur, tout en modifiant leur aspect, texture et leur consistance. Le processus d'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des composants du caillé. La coagulation et l'égouttage ont assuré la préparation d'un substrat essentiellement constitué de caséine, de matière grasse et de lactose, partiellement convertie en lactate. Ce substrat est peuplé de micro-organismes et, au cours de l'affinage, ces constituants seront transformés sous l'action d'enzymes présentes à l'origine dans le caillé ou élaborées au cours même de l'affinage par synthèse microbienne (CHOISY *et al.*, 1997).

Au cours de l'affinage, il y a dégradation plus ou moins poussée de la caséine mais aussi des matières grasses. L'oxygène, l'humidité et la température d'entreposage jouent un rôle très important (GUIRAUD, 2003).

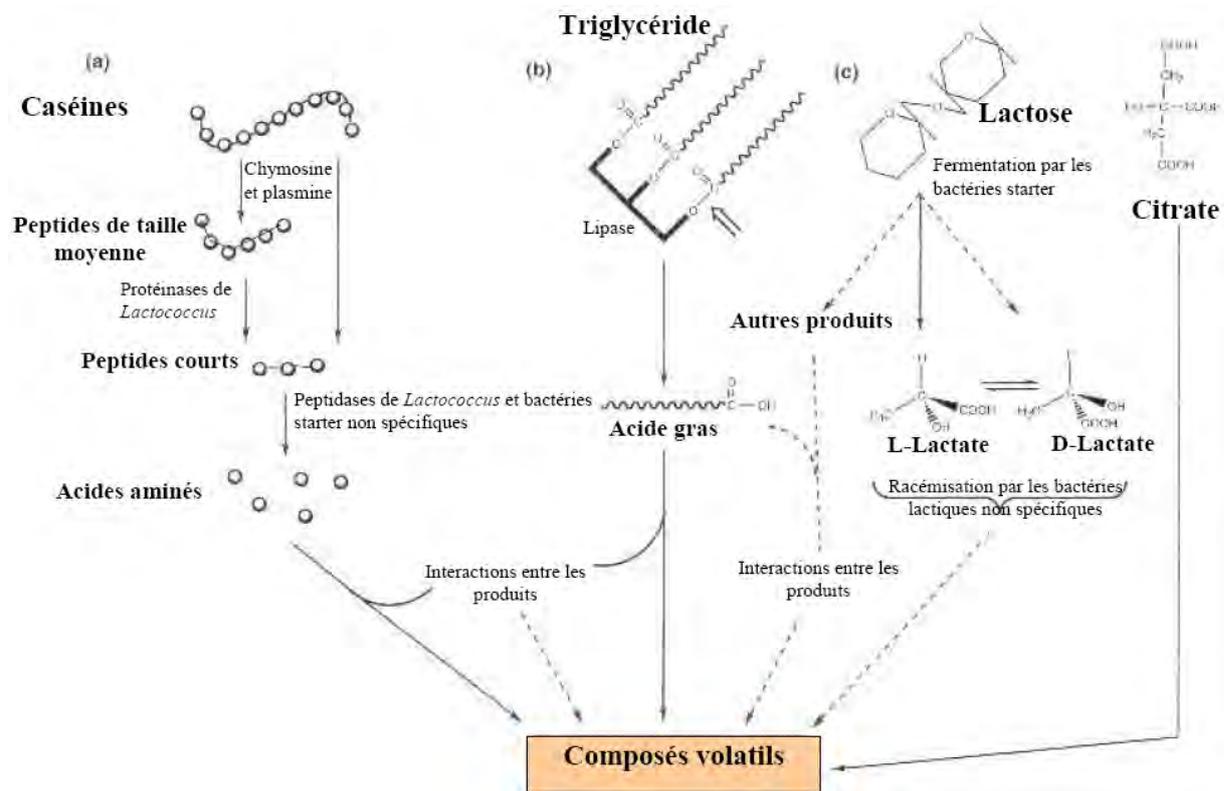


Figure 1 : Aperçu général des réaction biochimiques pendant l’affinage des fromages (FOX *et al.*, 2004)

Les enzymes, agents de l’affinage, ont trois origines : les enzymes indigènes ou natives du lait, les enzymes coagulantes, les enzymes des micro-organismes qui peuplent la pâte fromagère (CHOISY *et al.*, 1997).

Les enzymes indigènes ou natives du lait : essentiellement la plasmin, la cathepsine D et lipoprotéine lipase (FOX et KELLY, 2006).

Les enzymes coagulantes : on trouve la présure qui a une double activité l’une spécifique à la caséine k et l’autre de protéolyse générale (ECK et GILLIS, 1997).

Les enzymes des micro-organismes qui interviennent au cours de l’affinage par l’action de leur enzymes exo et/ou intracellulaire (ECK et GILLIS, 1997). Ces enzymes appartiennent à 04 groupes :

Les enzymes protéolytiques : qui se subdivisent en deux sous-groupes, les endopeptidases (ou protéases) qui hydrolysent les protéines en libérant des peptides et les exopeptidases qui scindent les peptides en acides aminés libres. Les lipases hydrolysent les triglycérides en acides gras et glycérides partiels.

Les systèmes actifs sur les acides aminés modifient ou décomposent les aminoacides libérés par les exopeptidases. Tandis que, les systèmes actifs sur les acides gras ou leurs dérivés sont à l'origine de la formation des acides bi-cétoniques, de méthylcétones, d'alcools secondaires (CHOISY *et al.*, 1997).

2-3 Classification des fromages

La classification d'un fromage (tableau 1), tel que défini par la norme du codex alimentaire CODEX STAN A-6. (1978) est obtenue après l'application de trois formules.

Tableau 1: Classification des fromages selon la norme CODEX STAN A-6. (1978)

Si la H.R.E.D.* est, en %	Terme I La 1 ^{ère} phrase de la désignation doit être	Si la M.G./E.S.** est, en %	Terme II La deuxième phrase de la désignation doit être	Terme III Désignation d'après les principales caractéristiques de maturation
< 41	Pâte extra dure	> 50	Très gras	1. Mûri ou affiné a. surtout l'extérieur b. surtout l'intérieur 2. Mûri ou affiné aux moisissures a. surtout l'extérieur b. surtout l'intérieur 3. Non mûri ou non affiné***
49 - 56	Pâte dure	45 - 60	Gras	
54 - 63	Pâte demi-dure	25 - 45	Demi-gras	
61 - 69	Pâte demi-molle	10 - 25	1/4 de gras	
> 67	Pâte molle	< 10	Maigre	
*H.R.E.D. = humidité rapportée à l'extrait sec dégraissé, soit $\frac{\text{Poids de l'humidité du fromage}}{\text{Poids total fromage} - \text{poids matière grasse}} \times 100$				
** M.G./E.S. = matière grasse sur extrait sec, soit $\frac{\text{Teneur en matière grasse du fromage}}{\text{Poids total fromage} - \text{poids matière grasse}} \times 100$				
*** Le lait destiné à ce type de fromage doit être pasteurisé.				
Exemples :				
Sorte	Origine	M.G./E.S.	H.R.E.D.	Terme I
Parmesan	I	35+	≈ 40%	Pâte extra-dure
Grana	I	35+	≈ 41%	Pâte extra-dure
Emmental	CH	45+	≈ 52%	Pâte dure
Gruyère	F	45+	≈ 52,5%	Pâte dure
Cheddar	UK	50+	≈ 5%	Pâte dure/demi dure
Gouda	NL	45+	≈ 57%	Pâte demi-dure
Tilsit	D	45+	≈ 57%	Pâte demi-dure
Havarti	DK	45+	≈ 59%	Pâte demi-dure
Rieu	DK, F, S etc.	50+	≈ 61%	Pâte demi-dure/demi-molle
Brie	F	45+	≈ 68%	Pâte demi-molle
Fromage frais	USA	> 10	< 69%	Pâte molle

3- Fromage traditionnel Bouhezza

Bouhezza est un fromage traditionnel algérien, fabriqué et consommé de puis l'antiquité par les populations *Chaouia*, qui vivent dans la région d'Aurès (Nord Est d'Algérie) (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2012). *Chaouia* est la dénomination donnée aux populations berbères de l'Aurès, ces habitants étaient connus par leur activité pastorale et principalement l'élevage ovin. Le mot *Chaouia*, qui découle du mot arabe « *El Chett* ou *El Chieh* » qui signifie ovin(s), se réfère à leur élevage des ovins, ces berbères sont localisés définitivement dans les zones montagneuses de l'Aurès et ont délaissés la vie de déplacement (EL CHAFII, 1987, cité par AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; SAOUDI, 2012).

Bouhezza est un fromage fermier à égouttage spontané et à pâte épicée, non moulée, préparé à l'origine à partir de lait de chèvre et éventuellement de brebis (ZAIDI *et al.*, 2000). Mais actuellement, et selon l'élevage des familles, le lait de chèvre, de brebis et/ou de vache peut être employé (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

La fabrication de *Bouhezza* est caractérisée essentiellement par la préparation de la *Chakoua*, et du *Lben*. La *Chekoua* est la peau animale entière (peau chèvre ou brebis, mais celle de chèvre est la plus utilisée) qui a subi un traitement spécial pour donner la forme d'un récipient utilisé pour la fabrication de *Bouhezza*.

3-1 *Lben*

Lben est un produit lacté classé dans la catégorie « lait fermenté » très répandu en Algérie où il est consommé aussi bien à la campagne qu'en ville (TOUATI, 1990). *Lben* est fabriqué à partir du lait de vache, de brebis ou de chèvre. Le lait subit une acidification spontanée par sa flore originelle jusqu'à coagulation. Le caillé obtenu est introduit dans la *Chekoua* où il subit une forte agitation ou barattage, un certain volume d'eau chaude ou froide suivant la température ambiante est ajoutée (HALLEL, 2001).

Il est souvent consommé avec de galettes, ou de dattes selon les régions (TOUATI, 1990). Il joue un rôle de sauce, en particulier pour le couscous aux fèves ou aux raisins secs (*Mesfouf*) très apprécié durant l'été et à la période du Ramadhan (HARRATI, 1974).

3-2 Préparation de la *Chekoua*

La *Chekoua* de *Bouhezza* se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur naturelle de la peau et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, elle joue un rôle à

la fois d'un contenant de la masse fromagère et d'un séparateur de phase (égouttage). C'est à travers les perforations naturelles de la peau que le lactosérum est exsudé (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006).

La préparation de *Chekoua* consiste à utiliser la peau de différentes races (chèvre ou brebis). La peau de chèvre ou de chevreau semble faciliter l'égouttage, elle est plus épaisse, solide et résistante aux chocs (BENMASSAI et FATHALLAH, 2009). Avant l'utilisation, la peau nécessite un traitement approprié. Elle est laissée se putréfier à température ambiante 2 à 7 jours pour faciliter l'arrachage des poiles ou de la laine. Après lavage avec l'eau, la peau est traitée principalement par le sel et le genièvre, également d'autres produits (tanin, romarin, semoule, orge) peuvent être incorporés (AISSAOUI ZITOUN, 2004). Ensuite la peau est laissée au repos pendant une à deux semaines pour éliminer l'odeur de putréfaction et la rendre plus solide. Après cette étape, la peau doit être retournée (coté poile à l'intérieur et coté chaire à l'extérieur) puis elle sera nouée et ficelée pour lui donner la forme d'un sac.

La peau peut être conservée quelques mois à plus d'une année, si elle est bien séchée et au soleil avec l'utilisation du sel et du genièvre (BENMASSAI et FATHALLAH, 2009).

KALIT *et al.*, 2010 ont décrit un procédé pour la préparation de peau animale pour l'affinage de plusieurs types de fromages traditionnels produits en Croatie, Bosnie, Herzégovine, Monténégro et Turquie. Ce procédé a beaucoup de points communs avec le procédé de préparation de la *Chekoua*. Selon ces auteurs, la préparation du sac exige une technique particulière au cours de l'arrachage pour éviter n'importe quels dommages de la peau. La laine (ou bien les poiles) et le suif sont éliminés, puis la peau est lavée dans l'eau plusieurs fois. Ensuite, elle est séchée au soleil et nouée et ficelée pour donner la forme d'un sac. Avant de mettre la pâte fromagère à l'intérieur du sac pour la maturation, la peau est imbibée avec de l'eau chaude pour se ramollir.

3-3 Fabrication de *Bouhezza*

La préparation de *Bouhezza* débute habituellement en mois de mars jusqu'au mois de juin (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; BENMASSAI et FATHALLAH, 2009), et s'étale de plusieurs semaines à quelques mois. Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément durant la période de fabrication (ZAIDI *et al.*, 2000 ; AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011). La consommation de fromage est possible à partir d'un mois de fabrication.

Les laits des différentes races peuvent être utilisés, seuls ou en mélange, mais il existe des familles qui n'utilisent jamais le mélange de lait des différentes races pour la même fabrication, et le *Lben* utilisé est acide et moyennement gras (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; LAMOUCHE, 2007 ; BENMESSAI et FATHALLAH, 2009). L'utilisation du lait de brebis est plus répandue dans les Wilayas de Batna et Khenchela. A nos jours, c'est le lait de vache qui est le plus utilisé car c'est le plus disponible (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

La préparation de fromage est réalisée par l'introduction d'une quantité de *Lben*. Cette quantité est complétée durant toute la période de fabrication par des ajouts successifs de *Lben* et enfin de lait cru. Le *Lben* de fabrication est de préférence écrémé et peu acide. L'ajustement des ajouts se réalise en fonction de la vitesse de l'égouttage et la disponibilité de la matière première. (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; LAMOUCHE, 2007 ; BENMESSAI et FATHALLAH, 2009). La *Chekoua* est suspendue dans un endroit aéré, et à l'ombre et bien entretenue au cours de la fabrication par des lavages réguliers à l'aide de l'eau avec raclage de sa surface externe (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

Le salage se fait dans le *Lben* ou directement dans la pâte fromagère. La quantité ajoutée est très variable d'une famille à l'autre [20 à 125 g/l]. Chez toutes les familles, la correction du goût salé ou acide se fait par l'ajout de lait cru après dégustation (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006).

Une fois que le fromage est élaboré, les fabricants l'épicent avec un broyât de piment rouge nommé «*kalb el serdouk* » finement moulu (AISSAOUI ZITOUN, 2004).

Le fromage est conservé dans la *Chekoua*, il peut être conservé aussi dans des récipients en verre ou en plastique (AISSAOUI ZITOUN, 2004). Le fromage peut être consommé sous forme de pâte plus ou moins ferme, de tartine sur pain ou déshydraté après séchage pour assaisonnement des plats traditionnels (*Aiche* et *Couscous...*) (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; BEDIARE et BEN HANAYA, 2006).

De point de vue consistance, la pâte du *Bouhezza* est peu molle et caractérisée par un goût peu piquant de piment rouge et une acidité assez prononcée. D'après les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011), *Bouhezza* retrouve sa place dans la classification du Codex alimentarius, c'est un fromage à pâte molle (Teneur en Eau dans le Fromage Dégraissé

« TEFD » de 72%), migras (Taux de Matière Grasse dans l'Extrait Sec « MGES » de 30% et affiné principalement dans la masse.

4- Fraction lipidique des fromages

Dans l'alimentation, les acides gras sont une source importante d'énergie, car leur valeur calorique est environ le double de celle des carbohydrates et des protéines. Les acides gras polyinsaturés (acide linoléique, acide α -linoléique) doivent être apportés par l'alimentation, car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme. Ces acides gras essentiels sont les précurseurs des autres acides polyinsaturés à longue chaîne (C20 et C22), qui jouent un rôle important dans la structure membranaire et les fonctions, et sont les précurseurs de la synthèse des eicosanoïdes. Ces derniers, influencent le processus inflammatoire, l'immuno-réaction, la thrombose et le fonctionnement des plaquettes, commandent la contraction des muscles lisses et le métabolisme d'os. Ils agissent en tant que le second messager des hormones, et ils ont le même rôle des hormones dans l'environnement direct de leur formation (effets d'autocrine) et ont également l'influence sur cellules voisines (effets de paracrine) (KOOLMAN et RÖHM, 1997).

Physiologiquement, les acides gras polyinsaturés actifs contiennent normalement les doubles liaisons en configuration *cis* (GNÄDIG, 2002).

Les acides gras polyinsaturés peuvent être conjugués ou non-conjugués. Le terme non conjugué indique que les deux doubles liaisons le long de la chaîne hydrocarbonée sont séparées par au moins un groupe méthylène $-CH_2-$ (ou au moins deux simples liaisons). Le terme conjugué signifie « couplé » et indique que les deux doubles liaisons sont séparées par une simple liaison. La majorité des doubles liaisons des acides gras polyinsaturés trouvés dans la nature sont non conjuguées. Les acides linoléiques conjugués $-ALC-$ (ou CLA pour Conjugated Linoleic Acids) sont des isomères conjugués de l'acide linoléique (18 carbones de carbone, 2 doubles liaisons). En tenant compte des 14 positions ($\Delta 2,4$ à $\Delta 15,17$) pour les doubles liaisons conjuguées et des 4 combinaisons géométriques (*cis,cis*, *cis,trans*, *trans,cis*, et *trans,trans*), 56 isomères sont théoriquement possibles. Actuellement, seulement une vingtaine ont été identifiés avec une prédominance quantitative de l'isomère C18:2 *cis-9, trans-11* (acide ruménique, AR) et *trans-10, cis-12* (LEDOUX M, 2006). D'autre part, les ALC peuvent être inclus dans le groupe des acides gras *trans* (GNÄDIG, 2002). Les produits laitiers sont une source importante des ALC, et surtout d'acide ruménique qui représente 80 -

93% des ALC de la matière grasse laitière (CHIN *et al.*, 1992 ; LAVILLONNIERE *et al.*, 1998). Parmi les produits laitiers, le fromage est très intéressant par sa teneur élevée en ALC. Selon LAVILLONNIÈRE *et al.* (1998) la teneur des ALC dans les fromages est entre 5.3 et 15.8 mg/g de matière grasse.

Connus depuis les années 30, les acides linoléiques conjugués n'ont attiré que récemment l'attention des scientifiques pour leurs propriétés physiologiques potentiellement intéressantes pour la santé : réduction de cancers chimio-induits chez l'animal, effets immunitaires, impact potentiel sur la cholestérolémie et l'athérogenèse, action sur la répartition de la masse grasse corporelle, implication dans la prévention et le traitement du diabète de type 2, influence sur les composantes du syndrome métabolique...(LEDOUX, 2006).

4-1 Isomères conjugués de l'acide linoléique

ALC est un groupe d'isomères insaturés d'acide gras qui se trouvent naturellement dans les aliments dérivés des ruminants, et leur concentration la plus élevée est trouvée dans le lait de bovin (CHIN *et al.*, 1992 ; DHIMAN *et al.*, 1999a,b; KELSEY *et al.*, 2003 ; AYDIN , 2005). Les acides linoléiques conjugués est le terme collectif employé pour décrire les isomères géométriques (*cis/cis*, *cis/trans*, *trans/cis*, *trans/trans*) et positionnels (position de double liaison 7-9 ; 8-10 ; 9-11; 10-12 ; 11-13 et 12-14) de l'acide octadécadiénoïque (C18:2) (AYDIN, 2005 ; RICKERT *et al.*, 1999 ; STANTON *et al.*, 1997) (tableau 2) contenant un système insaturé conjugué de double liaison, qui consiste à deux doubles liaisons, séparés par une liaison avec une atome de carbone au lieu d'un groupe méthylène (CHIN *et al.*, 1992 ; DHIMAN *et al.*, 1999a,b ; PARODI., 1999 ; DHIMAN *et al.*, 2000 ; DONOVAN *et al.*, 2000 ; GRIINARI *et al.*, 2000 ; DUGAN *et al.*, 2001 ; ABU-GHAZALEH *et al.*, 2002a ; PARODI., 2003). C'est important car les différents isomères ont différents attributs et certains, à la différence d'autres, peuvent être bénéfiques pour la santé animale et humaine (KELLY, 2001).

Tableau 2: Composition moyenne en isomères de position et géométrique d'acide linoléique conjugué (% d'isomères totaux) du lait, beurre et fromages affinés.

Isomères d'ALC	Lait ¹	Beurre	Fromages affinés
<i>Isomères cis, trans</i>			
7, 9	5.5	6.7	3.6
8, 10	1.5	0.3	1.0
9, 11	72.6	76.5	83.5
10, 12	0.4	1.1	=
11, 13	7.0	0.4	4.7
11, 13	=	-	=
12, 14	0.7	0.8	0.4
Isomère totaux <i>cis, trans</i> (<i>trans, cis</i>)	87.7	85.8	93.2
<i>Isomères trans, trans</i>			
6, 8	-	0.1	0.7
7, 9	2.4	-	0.6
8, 10	0.4	-	0.3
9, 11	2.0	-	1.5
10, 12	0.6	-	0.5
11, 13	4.2	-	2.3
12, 14	2.8	-	0.9
13, 15	-	-	0.1
Total <i>trans, trans</i>	12.3	9.4	6.3
<i>Isomères cis, cis</i>			
8, 10	-	-	<0.1
9, 11	-	-	0.3
10, 12	-	-	<0.1
11, 13	-	-	0.3
Total <i>cis, cis</i>	-	4.8	0.7
CLA totaux (% matière grasse)		0.5	0.93

¹SHINQFIELD et al., (2003)

4-1-1 Origine des acides linoléiques conjugués

ALC sont naturellement formés par la biohydrogénation ruminale ou bien par synthèse endogène dans les tissus adipeux et les glandes mammaires (figure 2).

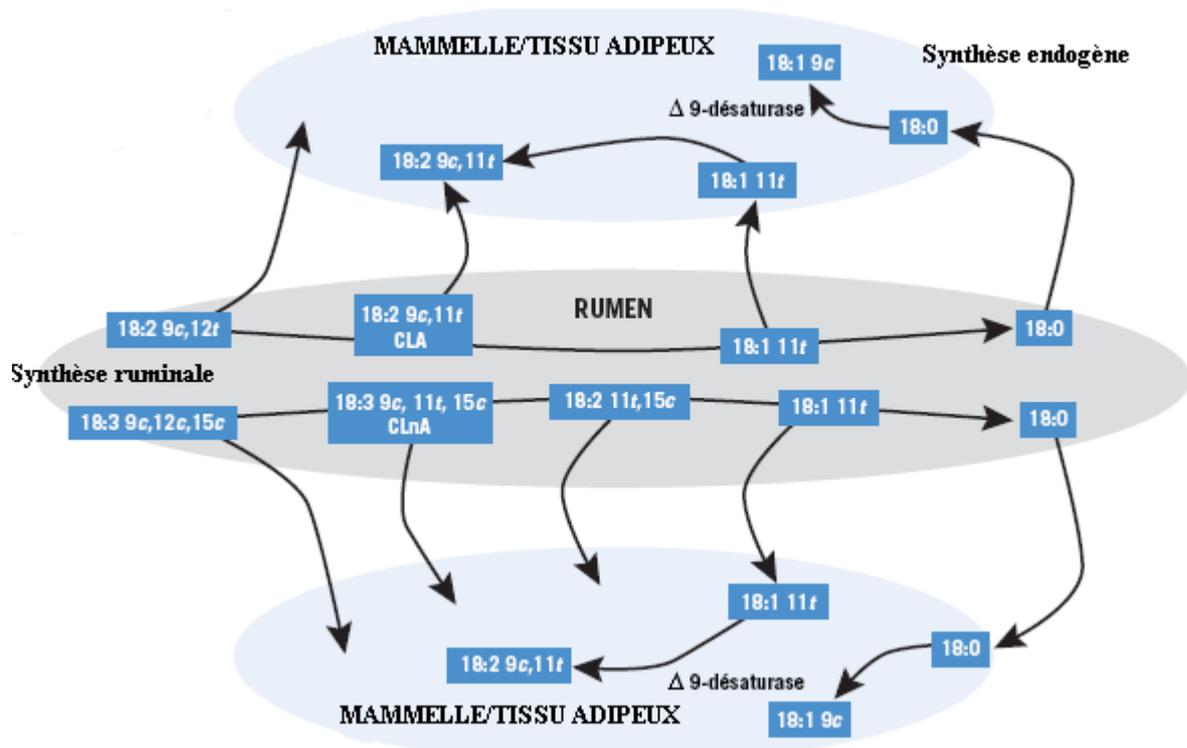


Figure 2 : Biohydrogénation ruminale, absorption, et transformation tissulaire des acides linoléique et linoléinique, et de leurs dérivés (CHILLIARD Y *et al.*, 2001. Cité par LEDOUX, 2006).

La biohydrogénation des acides gras polyinsaturés ingérés (acide linoléique et acide linoléinique) ou produits à l'aide des lipases hydrolysant les triglycérides, phospholipides et glycolipides (KHANAL et DHIMAN, 2004), en acide stéarique est réalisée par les enzymes des différentes bactéries de la flore ruminale (HARFOOT et HAZELWOOD, 1998).

Différents acides gras *trans* apparaissent le long de cette voie de biohydrogénation comme intermédiaires, c'est le cas principalement de l'isomère C18 :2 *cis*-9, *trans*-11 (isomère principal du lait) et l'acide vaccénique C18 :1. KEPLER et TOVE. (1967) ont pu extraire une linoléate isomérase (EC 5.2.1.5) à partir des bactéries de rumen «*Butyrivibrio fibrisolvens*» responsable de l'isomérisation de l'acide linoléique en acide ruménique en première étape. Dans la seconde étape, la double liaison en position $\Delta 9$ est hydrogénée pour former l'acide *trans*-vaccénique. L'étape finale de la bioconversion consiste à la réduction de l'acide *trans*-vaccénique en acide stéarique, ceci semble une réaction limitée, les produits intermédiaires sont accumulés (KEMP *et al.*, 1975) et ils seront absorbés par l'intestin et incorporés dans les différents tissus.

Dans la deuxième voie, ALC sont formés par $\Delta 9$ désaturation de l'acide *trans*-vaccénique (7t et 11t) transformé respectivement en isomères *trans*-7, *cis*-9 et *cis*-9, *trans*-11 dans les tissus adipeux et les glandes mammaires de lactation des vache (GRINARI *et al.*, 2000 ; CORL *et al.*, 2002). La synthèse endogène dans les glandes mammaires a été rapportée d'être la plus importante, environ 60% des ALC dans la matière grasse laitière est formée par cette voie durant la lactation des vaches, ce qui explique la prépondérance de l'acide ruménique sur les autres ALC et la deuxième place en terme quantitatif du 18:2 7t, 9c. Si ces deux isomères sont principalement produits au niveau mammaire, les autres ALC semblent provenir surtout de la biohydrogénation ruminale (PIPEROVA *et al.*, . Cité par LEDOUX, 2006).

4-1-2 Propriétés physiologiques des acides linoléiques conjugués

En raison de leurs effets physiologiques bénéfiques, principalement démontrés chez les rongeurs, les ALC ont été le sujet d'un nombre croissant d'études scientifiques ces dernières années (GNÄDIG S, 2002). L'acide ruménique (*cis*-9, *trans*-11) est le plus actif biologiquement (KRAMER *et al.*, 1998 ; ELLEN et ELGERSMA, 2004 ; DESTAILLATS *et al.*, 2005), également c'est l'isomère de C18:2 le plus abondant et constitue plus de 94 % des ALC dans les produits laitiers (DUGAN *et al.*, 2001 ; COLLOMB *et al.*, 2004 ; DHIMAN *et al.*, 2005).

Selon PARIZA (2000), l'acide ruménique et l'isomère *trans*-10, *cis*-12 peuvent être responsables de différents effets biologiques, et dans certains cas ils peuvent avoir un effet cumulatif. La structure de ces deux derniers isomères est représentée sur la figure suivante (figure 3):

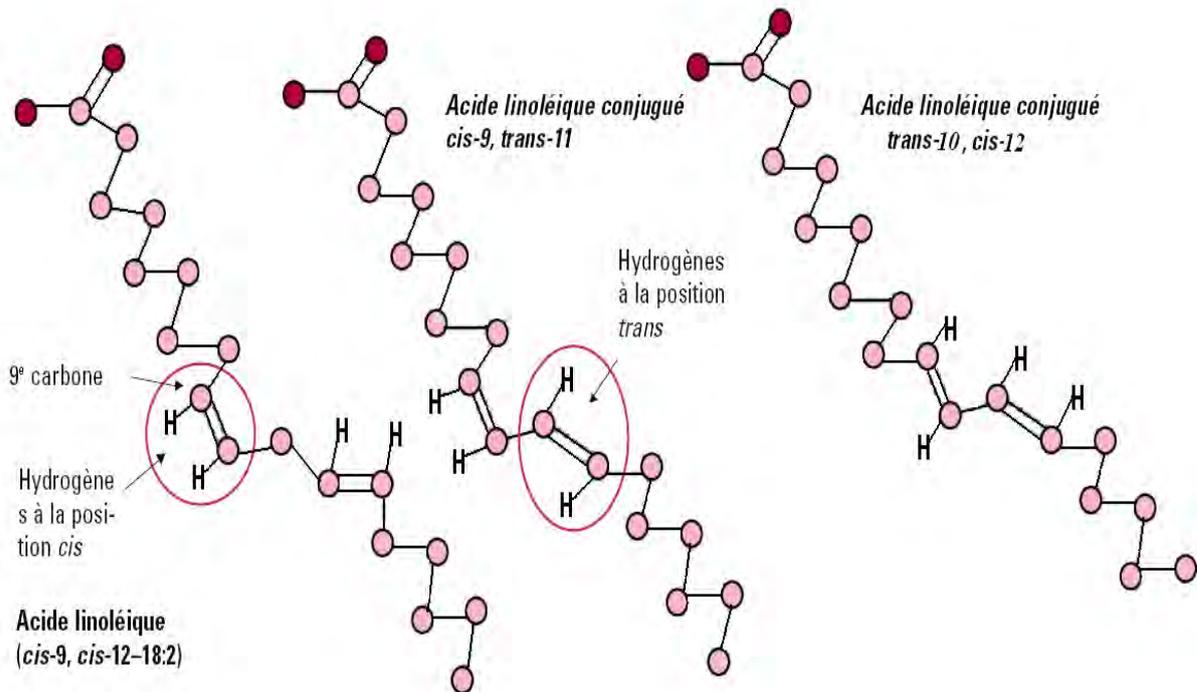


Figure 3: Structures chimiques d'acide linoléique ordinaire et les deux principaux acides linoléiques conjugués *cis-9, trans-11* et *trans-10, cis-12* (Anonyme 1)

4-1-3 Métabolisme des acides linoléiques conjugués

L'incorporation des ALC semble se faire dans tous les tissus animaux étudiés, à l'exception du cerveau. L'acide ruménique (AR) est l'isomère le mieux incorporé dans les lipides tissulaires (BANNI *et al.*, 2001 ; SEBEDIO *et al.*, 1997); les ALC sont incorporés principalement dans les lipides neutres, cependant l'acide ruménique est également retrouvé dans les phospholipides (IP *et al.*, 1994 ; HA *et al.*, 1990). Les taux des ALC mesurés dans le tissu adipeux augmentent avec les quantités apportées par l'alimentation (MILLER *et al.*, 1994).

Les ALC sont incorporés dans les tissus chez le porc, la volaille, et le poisson lorsque leur alimentation est enrichie avec des mélanges des ALC (DUGAN *et al.*, 2004 ; AZAIN, 2003). De ce fait, les ALC peuvent entrer dans la chaîne alimentaire humaine par la viande des non ruminants.

Chez l'homme en effet, les ALC sont aussi retrouvés dans les graisses de réserve en proportions des taux apportés par l'alimentation (JIANG *et al.*, 1999 ; COUET *et al.*, 2004). Dans le sérum de grands consommateurs de beurre, 58-78% de l'acide ruménique se trouve sous forme de triacylglycérols, 16-34% sous forme de phospholipides et 2-8% sous forme d'esters de cholestérol (FOGERTY *et al.*, 1988).

La métabolisation des ALC permet leur conversion en isomères conjugués du 18:3 n-6 et du 20:3 n-6, voire même en 20:4 n-6 (BANNI *et al.*, 1995 ; BANNI *et al.*, 1996 ; BANNI *et al.*, 2001 ; SEBEDIO *et al.*, 1997). Toutefois, l'acide ruménique et l'isomère 18:2 *trans*-10, *cis*-12 ne montrent pas les mêmes affinités pour les différentes désaturases impliquées dans ce métabolisme (BERDEAUX *et al.*, 2002).

4-1-4 Acides linoléiques conjugués et composition corporelle

Les études réalisées avec les souris, poulets, et porcs ont suggéré un rôle possible des ALC (principalement l'isomère *trans*-10, *cis*-12) dans la diminution de la masse grasse corporelle et l'augmentation de la masse maigre (PARC *et al.*, 1997 ; WEST *et al.*, 1998). Une étude dans le connexe humain a suggérée que les ALC augmentent la masse corporelle sans augmenter la masse grasse (KREIDER *et al.*, 2002). Mais en général chez l'homme, les résultats sont contradictoires certaines études font état d'une baisse modérée de la masse grasse, d'autres ne révèlent aucun effet significatif. Les protocoles et les méthodes utilisées sont cependant trop disparates pour pouvoir comparer les résultats (les doses d'ALC administrées varient notamment de 1,4 g/jour à 6,8 g/jour) (PARK *et al.*, 1999b ; MOUGIOS *et al.*, 2001).

4-1-5 Acides linoléiques conjugués et pathologies

4-1-5-1 Acides linoléiques conjugués et cancer

L'effet anticancéreux trouvé avec la consommation des ALC est le plus intensivement étudié parmi les propriétés physiologiques potentiellement intéressantes pour la santé qui ont été identifiées. En 1987, il a été montré que des souris recevant des extraits de viande bovine grillée développaient moins de papillomes et présentaient une moindre incidence de tumeurs chimio-induites que des souris témoins ; l'effet étant attribué aux ALC (HA, 1987). Par la suite, l'utilisation de différentes espèces animales (souris, rates, hamsters), de diverses lignées cellulaires cancéreuses, et de différents modèles de cancérogenèse ont permis de confirmer le

rôle protecteur des ALC en cancérogenèse expérimentale pour différents sites : peau (HA, 1987), estomac (MILLER *et al.*, 1994), foie (DESBORDES et LEA, 1995), poumon (SCHONBERG, KROKAN, 1995), mamelles (IP *et al.*, 1991, KOHNO *et al.*, 2002), et côlon (CHENG *et al.*, 2003 ; KIM et PARK, 2003). L'effet inhibiteur des ALC semble s'exercer aux différentes phases de la cancérogenèse : initiation (IP *et al.*, 1995 ; BELURY *et al.*, 1996 ; ZU *et al.*, 1992), promotion et croissance tumorales (IP *et al.*, 1991 , BELURY *et al.*, 1996), et formation de métastases (HUBBARD *et al.*, 2000 ; VISONNEAU *et al.*, 1997). Les effets sur la promotion tumorale s'observent dès 0,1% d'ALC (en poids) dans le régime alimentaire et augmentent linéairement avec la dose jusqu'à 1% (IP *et al.*, 1991 ; CHENG *et al.*, 2003). L'activité antitumorale des ALC est indépendante de la nature de l'agent cancérogène utilisé ou des lipides (nature et quantité) de la ration (IP *et al.*, 1996 ; IP *et al.*, 1997). Les mécanismes par lesquels agissent ne sont pas connus, mais quelques théories sont que les ALC réduisent la prolifération des cellules, par le changement de divers composants du cycle cellulaire, et induisent l'apoptose (BELURY, 2002).

In vitro les ALC empêchent la croissance d'un grand nombre de diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines (PARODI, 1999 ; DURGAM et FERNANDES, 1997). Dans plusieurs études du cancer humain, une relation inverse a été trouvée entre la concentration d'ALC dans le régime et le risque de développement du cancer dans le tissu adipeux de sein (DURGAM et FERNANDES, 1997 ; THOMPSON *et al.*, 1997 ; VISONNEAU *et al.*, 1997, BOUGNOUX *et al.*, 1999).

Quelques études ont essayé d'établir un régime efficace pour assurer une protection contre le cancer (BAUMAN *et al.*, 2001). Pour tester la réponse positive des ALC sur la santé humaine, il doivent être consommés en quantité suffisante (PARODI., 2003 ; WEISS *et al.*, 2004b). Selon KELLY *et al.* (1998a), les effets anticancérogènes des ALC se produisent à des concentrations diététiques, la prise moyenne courante des humains est proche du niveau diététique démontré avoir des effets anticancérogènes sur des modèles d'animaux d'expérience (MA *et al.*, 1999 ; PARODI, 1994). Il est possible d'augmenter la prise des ALC par la consommation des aliments riches en ALC.

IP *et al.* (1994) ont proposé qu'une prise de 3.5 g d'ALC /jour pour une personne de 70 kilogrammes puisse être suffisante pour la protection contre le cancer. Selon DHIMAN *et al.* (2005) le lait entier contient en moyenne 3.5 % de matière grasse dont les ALC représentent

0.5 %. Par conséquent, en servant (227 ml) du lait entier et d'une portion de fromage (30g) peuvent fournir 90mg des ALC. C'est seulement 25 % de la quantité suggérée par IP et *al.* (1994).

Cependant, KNECHT *et al.* (2001) ont constaté que le risque de cancer de sein a été divisé en deux chez les femmes qui ont consommé plus de 620 ml de lait par jour, comparées à celles consommant moins de 370 ml par jour.

4-1-5-2 Acides linoléiques conjugués et réponse immunitaire

Chez les animaux d'expériences, les ALC amplifient certains effets immunologiques (blastogenèse des lymphocytes, activité cytotoxique, activité des macrophages) et préviennent les dommages collatéraux des réactions immunitaires (réduction de la réponse catabolique aux endotoxines) (MILLER *et al.*, 1994 ; COOK *et al.*, 1999, COOK *et al.*, 1993).

Chez l'homme, l'acide ruménique et l'isomère *trans*-10, *cis*-12 (administrés séparément) réduisent l'activation des lymphocytes T ; on observe une relation inverse entre l'activation des lymphocytes T et les proportions d'ALC dans les lipides des cellules mononucléaires sanguines (TRICON *et al.*, 2004). Mais une étude de NUGENT *et al.* (2005) menée sur 55 volontaires montre que la supplémentation en ALC a des effets modestes sur les fonctions immunitaires et ne présente pas de bénéfices supérieurs à l'acide linoléique.

D'autre part, une expérience de la production spécifique d'anticorps après la vaccination par l'hépatite B a été testée par un traitement avec les ALC. La formation d'anticorps après le traitement avec (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 / C18:2 *trans*-10, *cis*-12 ; 50/50) était sensiblement supérieure (MOHEDE *et al.*, 2001), suggérant que les ALC ont pu pouvoir augmenter la fonction immunitaire chez l'homme.

4-1-5-3 Acides linoléiques conjugués et facteurs de risque cardio-vasculaire

Un autre effet a été décrit chez les animaux d'expérience par l'alimentation enrichie en ALC, c'est l'inhibition de l'athérosclérose induit par le cholestérol. Les ALC diminuent sensiblement la cholestérolémie (totale, LDL et HDL) chez les lapins et protègent contre l'accumulation artérielle des lipide (LEE *et al.*, 1994). Une autre étude qui a été faite sur les animaux d'expérience montre une diminution de 30% des lésions athérosclérotiques (KRITCHEVSKY *et al.*, 2000). Le fait qu'il y a une relation possible entre les ALC et l'athérosclérose chez l'homme a un grand intérêt dans la recherche (GNÄDIG, 2002).

Les ALC ont été décrits pour induire un effet antithrombique. *In vitro*, plusieurs effets des isomères d'ALC sur l'agrégation des plaquettes humaines ont été examinés (TRUITT *et al.*, 1999). Un mélange d'ALC a été examiné par rapport à l'acide linoléique en utilisant des agents d'agrégation des plaquettes comme l'acide arachidonique, le collagène et la thrombine. Les ALC étaient efficaces contre l'agrégation de plaquettes. Une expérience *in vivo* sur la fonction de plaquette a été réalisée chez l'homme, la prise journalière de 3,9g d'ALC pendant 63 jours n'a eu aucune influence de l'agrégation *in vitro* de plaquette, Les auteurs ont conclu que la consommation à court terme des ALC n'a pas montré les propriétés antithrombiques chez l'homme (BENITO *et al.*, 2001b). De ce fait, l'influence des ALC sur l'athérosclérose n'est pas claire et nécessite plus d'étude.

Chez l'homme de poids normal (IMC < 25), un mélange d'ALC n'entraîne pas de modification substantielle du métabolisme des lipoprotéines (BENITO *et al.*, 2001a ; NOONE *et al.*, 2002). Chez des sujets en surpoids, il augmente le taux de lipoprotéine (a) et diminue la cholestérolémie (totale, LDL et HDL) (BLANKSON *et al.*, 2000). Cet effet favorable serait imputable à l'acide ruménique, l'isomère 18:2 10t, 12c n'ayant pas d'action sur les lipoprotéines (TRICON *et al.*, 2004). Par ailleurs, les deux isomères diminuent l'activation des lymphocytes T, mais n'ont aucun effet sur les taux sériques de la protéine C-réactive ou la production de cytokine.

Vue la richesse de fromage en ALC, plusieurs études scientifiques ont été réalisées pour doser leur concentration dans plusieurs types de fromages dans le monde (JIANG *et al.*, 1998 ; NUNES CORTES *et al.*, 2010 ; ROMANO *et al.*, 2011).

Le nombre de publications sur les ALC montre l'intérêt scientifique et économique suscité par ces acides gras particuliers dont les propriétés biologiques semblent prometteuses (LEDOUX, 2006). Pour la caractérisation d'un fromage, il serait donc très important de les quantifier afin d'avoir plus d'informations utiles sur sa fraction lipidique.

4-2 β -carotène et α -tocophérol dans les fromages

La β -carotène et l' α -tocophérol sont deux molécules liposolubles possédant des propriétés antioxydantes. Elles sont impliquées dans les caractéristiques nutritionnelles et sensorielles des produits laitiers, et ayant un rôle important dans la prévention contre leur l'oxydation.

Ils s'appellent les antioxydants parce qu'ils arrêtent les processus chimiques de l'oxydation des molécules organiques. Les réactions d'oxydation peuvent être irréversibles, changeant ou endommageant les composés organiques tels que l'ADN. Les radicaux libres sont des composés fortement réactifs qui sont créés dans le corps au cours des fonctions métaboliques normales ou apportés de l'environnement. Les radicaux libres sont instables, puisqu'ils contiennent de l'énergie libre. Pour réduire leur énergie les radicaux libres réagissent avec certaines cellules dans le corps, et perturbent leur fonctionnement normal. En fait, les radicaux libres sont impliqués dans plus de soixante problèmes de santé, y compris le processus de vieillissement, le cancer, et l'athérosclérose. La réduction de l'exposition aux radicaux libres peut améliorer la santé.

Les antioxydants fonctionnent de plusieurs manières : ils peuvent réduire l'énergie du radical libre, arrêter la formation du radical libre en premier lieu, ou interrompre la chaîne d'oxydation pour minimiser les dommages aux molécules organiques dans le corps par les radicaux libres.

4-2-1 β -carotène

La β -carotène est une molécule qui appartient au groupe des caroténoïdes, elle peut être convertie en rétinol, et qualifiée comme une provitamine A. Une grande évidence épidémiologique suggère qu'une concentration élevée en β -carotène et autres caroténoïdes dans le sang soit associée à une diminution du risque de plusieurs maladies chroniques. La β -carotène est un antioxydant (figure 4), elle a un radical libre possédant des propriétés protectrices contre les dommages oxydatifs de l'ADN et la progression du cancer (PARODI, 1996).

BURTON et INGOLD. (1984) ont constaté que le β -carotène possède une bonne capacité de piégeage de radical libre pour arrêter le mécanisme de réaction en chaîne de radical libre dans l'oxydation des lipides à basses concentrations de l'oxygène qui sont typiquement trouvées dans les tissus.

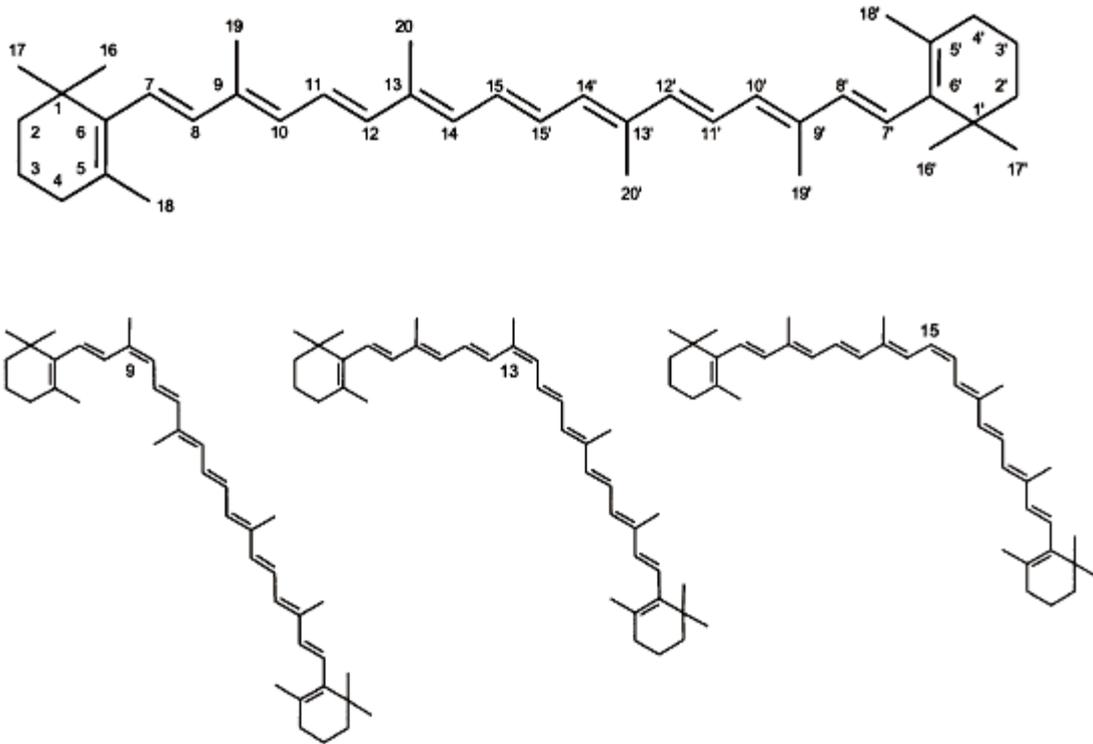


Figure 4 : Structure chimique de la β -carotène : *trans*- β -carotène, 9-*cis*- β -carotène, 13-*cis*- β -carotène et 15-*cis* β -carotène (SCHIERLE *et al.*, 2004).

Durant la fabrication du fromage, entre 800 et 950 g/kg du rétinol et caroténoïdes dans le lait original sont récupérés dans le caillé. Dans beaucoup d'études, peu ou pas de changement de la concentration de ces composants a été observé pendant la maturation ou le stockage du fromage pendant plus d'une année (HARTMAN et DRYDEN, 1965). Mais selon LUCAS *et al.* (2006), 950 g/kg de β -carotène, seulement 660 g/kg de rétinol et 640 g/kg des xanthoylles originellement présents dans la matière grasse du lait ont été récupérés dans la matière grasse de fromage. Ces résultats suggèrent que la β -carotène est très stable, tandis que, le rétinol et les xanthophylles sont partiellement endommagés et/ou perdus durant la fabrication du fromage (NOZIERE *et al.*, 2006).

4-2-2 α -tocophérol

La vitamine E est une vitamine liposoluble, elle est appelée également l' α -tocophérol ou vitamine anti-stérilité. Dans la nature il y a huit analogues de la vitamine E, y compris quatre types de tocophérol (α , β , γ et δ) et quatre sortes de tocotriénol (α , β , γ et δ). La vitamine E

naturelle est un composé des huit analogues (CHANG *et al.*, 2006). Selon leur structure et stéréochimie, les huit formes montrent différents pouvoirs biologiques, le RRR- α -tocophérol le plus actif, avec 100% de l'activité de la vitamine E (DREVON, 1991 ; ALVES *et al.*, 2009). Les autres analogues sont rarement stockés dans les cellules hépatiques en raison du manque de la protéine transporteuse correspondante, la plupart d'entre eux sont drainés loin du corps par la bile et les urines (DREVON, 1991). Dans le lait comme dans le fromage, l' α -tocophérol est la forme majoritaire de la vitamine E. L' α -tocophérol est un antioxydant primaire important, il agit en tant que neutralisateur des radicaux. Le radical tocophéryloxy formé est relativement stable et peut être reconverti en tocophérol par réduction avec de l'acide ascorbique.

Différents auteurs ont rapporté que la concentration de l' α -tocophérol dans le lait de bovin est entre 0.2 et 0.7 mg/l (JENSEN, 1995). Il a été montré que le colostrum contient environ 1.9 mg/l en α -tocophérol, après quatre jours cette concentration devient approximativement 0.3 mg/l (HIDIROGLOU, 1989).

5- Aperçu sur les techniques chromatographiques utilisées

Au cours des analyses, deux techniques chromatographiques ont été utilisées. La première est la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC), cette technique a été utilisée pour la séparation des acides gras polyinsaturés non conjugués, α -tocophérol et le β -carotène. La deuxième est la chromatographie liquide haute performance Ion Argent (Ag^+ -HPLC) appelée aussi la chromatographie argentée. Cette dernière est utilisée uniquement pour la séparation des acides linoléiques conjugués.

5-1 Principe général de chromatographie liquide haute performance

L'HPLC est devenue parmi les techniques de séparation largement appliquées dans l'analyse des lipides (CHRISTIE, 1987). Après qu'un début timide en raison des problèmes de détection, l'HPLC est développée rapidement quand de nouveaux détecteurs universels convenus aux lipides sont devenus disponibles (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 1992).

En HPLC les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles (figure 5), l'une stationnaire (silice vierge ou greffée, polymère moléculaire ou échangeur d'ions), l'autre mobile (phase liquide constituée par un solvant pur ou plus souvent par un mélange de solvants).

L'interaction du soluté avec la phase et la phase stationnaire peut être manœuvrée par différents choix du solvant et des phases stationnaires. Il en résulte que l'HPLC acquiert un degré élevé de polyvalence non trouvé en autre système chromatographique, en plus elle a la capacité de séparer facilement une grande variété des mélanges de produits chimiques.

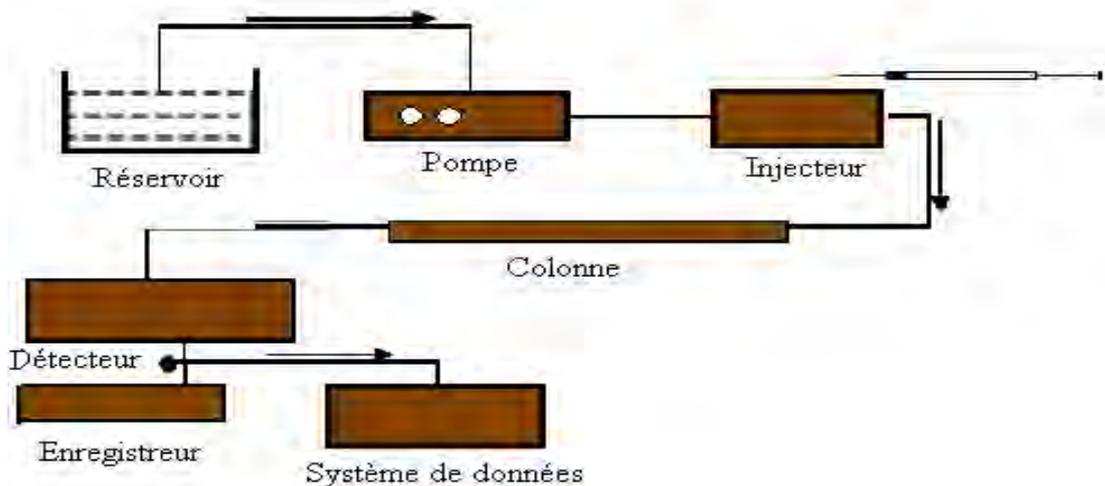


Figure 5: Schéma d'un système HPLC (TOZLOVANU, 2008)

Le détecteur placé à la sortie de la colonne est couplé avec un enregistreur permet l'enregistrement des pics relatifs à chaque constituant de mélange. L'ensemble des pics constitue le chromatogramme de mélange analysé.

5-2 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse

Selon la polarité de phase stationnaire, on distingue deux types de la chromatographie liquide haute performance :

- Chromatographie liquide haute performance en phase normale (HPLC-NP) : La phase stationnaire est fortement de nature polaire (gel de silice), et la phase mobile est non polaire (comme n-hexane, tétrahydrofurane). Les analytes polaires sont ainsi maintenus sur la surface polaire de la colonne plus longtemps que les matériaux moins polaires (ANONYME 2).
- Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) : La phase stationnaire est fortement apolaire, de nature hydrophobe, elle est constituée par des billes silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbone, cette phase est parcourue par

un éluant polaire, il s'agit d'un mélange d'acétonitrile, méthanol, eau. Dans ce cas le soluté le plus apolaire correspond au temps de rétention le plus long. Ce type d'HPLC couvre presque 90% de toutes les applications chromatographiques. La polarité d'éluant joue le rôle le plus important dans tous les types d'HPLC. Il y a deux types d'éluant : isocratique et gradient. Dans le premier type, la composition chimique de l'éluant pompé à travers la colonne est constante pendant toute l'analyse. Dans le deuxième type, la composition de l'éluant et son débit changent au cours de l'analyse (ANONYME 3).

5-3 Chromatographie liquide haute performance Ion Argent

La haute qualité analytique est nécessaire, pour déterminer la composition exacte d'un mélange complexe d'isomères d'ALC synthétique, dans une denrée alimentaire ou une matrice biologique (GNÄDIG, 2002). Le grand soin doit être pris avec l'analyse des ALC car ils sont instables et très sensibles à l'isomérisation (SHANTHA *et al.*, 1993). Les ALC peuvent être séparés en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à un détecteur d'ionisation à flamme (DIF). Pour obtenir une bonne séparation des isomères d'ALC, des colonnes capillaires polaires en cyanopropylsiloxane de longueur de 50 à 100 m sont employées. Cette technique reste insuffisante parce que les isomères de position ont le même temps d'éluant (RICKERT et STEINHART, 2001). L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance Ion-argent ou simplement chromatographie argentée (Ag^+ -HPLC) a amélioré la résolution des isomères de ALC, puisque deux à six colonnes ont été couplées en série. Les isomères d'ALC sont séparés en trois groupes selon la configuration des doubles liaisons, *trans-trans* ; *cis-trans/trans-cis* et *cis-cis* respectivement. En outre, l' Ag^+ -HPLC a mené à une meilleure séparation des ALC avec peu de co-élution comparée à la chromatographie en phase gazeuse (SEHAT *et al.*, 1999). Cette technique est très puissante pour les analyses des isomères géométriques et positionnels de méthylesters d'acide gras (ADLOF, 2003).

La chromatographie argentée est une chromatographie d'échange d'ion où la phase stationnaire a une surface ionique chargée de charge opposée aux ions témoin. Cette technique est employée presque exclusivement avec les échantillons ioniques ou ionisables. Plus la charge de l'échantillon est forte, plus il sera attaché fortement à la surface ionique et ainsi, plus il durera pour s'éluer. La phase mobile est un amortisseur aqueux, où le pH et la concentration ionique sont employés pour commander le temps d'éluant.

La chromatographie liquide haute performance Ion-Argent est basée sur une propriété distinctive des composés organiques insaturés qui est la capacité de se complexer avec la transition des métaux (figure 6). Dans ce cas avec l'argent, les complexes sont de type transfert de charge, c'est-à-dire le composé insaturé agit comme un donneur d'électron et l'ion argent comme accepteur (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 1992).

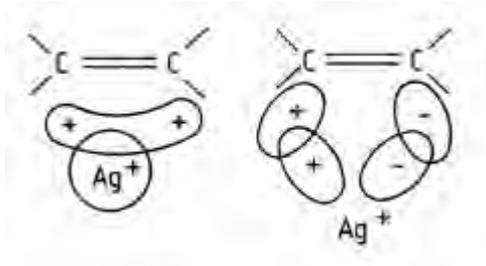


Figure 6 : Model de DEWAR de l'interaction de l'ion argent avec la double liaison oléfinique (MORRIS, 1966. Cité par : NIKOLOVA-DAMYANOVA, 1992).

Matériels et

Méthodes

1- Echantillons de fromage

Nous avons collecté séparément six échantillons de *Bouhezza* à partir de six fermes familiales localisées dans la région rurale de la wilaya d'Oum El Bouaghi Cette étude, s'insère dans le cadre de l'accord programme APQ (Accordo di Programma Quadro Medeterania-Algeria), programme d'appui à la coopération régionale "Développement de la Filière Laitière et Fromagère en Algérie ». Dans ce contexte, une convention de collaboration en recherche scientifique a été signée entre l'Université Mentouri Constantine (UMC-INATAA) d'une part, et le Consortium pour la Recherche en Filière Laitière et Fromagère (Conorzio per la Ricerca sulla Filiera Lattiero Casearia-Raguse (CoRFiLaC) de la Région de Sicile, Italie, de l'autre part. Ce travail est l'un des activités de la recherche scientifique réalisées durant la période de la convention (07/04/2010 au 30/06/2011).

Les échantillons de *Bouhezza* sont limités en nombre de six (tableau 3), à cause de la difficulté de leur fabrication, par rapport à période du stage (02/05/2011 au 30/06/2011). Ils sont préparés avec de lait de vache. La durée d'affinage dans la *Chekoua* est d'un mois. Trois échantillons sont épicés par la poudre de piment rouge nommé « *Kalb el serdouk* », le reste est non épicé. Le fromage *Bouhezza* est consommé épicé ou non selon les habitudes des familles (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011). Le tableau suivant résume l'ensemble des informations sur les échantillons de *Bouhezza*.

Tableau 3: Echantillons de fromage *Bouhezza*.

Echantillons	Nature	Age dans la <i>Chekoua</i> (jours)	Date de prélèvement à partir de la ferme
F1E	<i>Bouhezza</i> de la famille1 épicé	30	26/04/11
F2SE	<i>Bouhezza</i> de la famille2 sans épice	30	26/04/11
F3E	<i>Bouhezza</i> de la famille3 épicé	30	27/04/11
F4SE	<i>Bouhezza</i> de la famille4 sans épice	30	27/04/11
F5E	<i>Bouhezza</i> de la famille5 épicé	30	29/04/11
F6SE	<i>Bouhezza</i> de la famille6 sans épice	30	29/04/11

Les échantillons ont été prélevés à partir des fermes dans des boîtes stériles, ils ont été congelés puis transportés vers le centre de recherche CoRFiLaC (Consorzio per la Ricerca sulla Filiera Lattiero Casearia) dans une glacière. A l'intérieur de cette dernière, les boîtes contenant les échantillons ont été emballées dans des sacs isothermes pour maintenir leur état de congélation.

Au laboratoire, les échantillons ont subi immédiatement un échantillonnage suivant la norme ISO 707 (2008). D'abord, sur un logiciel informatique spécial au centre de recherche, les informations concernant chaque échantillon ont été saisies, après l'enregistrement, ce logiciel attribue un code de cinq chiffres pour chaque échantillon. Ensuite, les fromages ont été placés dans un récipient en plastique, puis homogénéisés en utilisant une spatule métallique, puis transféré dans des flacons avec couvercle, capacité approximativement 50g, étiqueté par le code correspondant. Le flacon doit permettre la congélation et la décongélation facile de l'échantillon. Au cours de remplissage, le fromage est pressé pour minimiser le vide au maximum, mais de sorte qu'il ne soit pas difficile à enlever. Enfin, les échantillons ont été conservés à -20°C .

Les échantillons ont été décongelés au réfrigérateur à $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ une nuit (12 à 16 h). Avant chaque mesure, 0.5cm de la surface de l'échantillon doit être enlevée et jetée parce qu'elle est en contact directe avec l'espace libre (head space) contenant différents types de substances volatiles de fromage. Plusieurs réactions biochimiques peuvent avoir lieu, alors cette couche n'est pas représentative de la composition réelle du fromage.

2- Diagramme de fabrication

A travers l'interview avec les fabricants des échantillons, qui sont en général des femmes au foyer, nous avons pu résumer les différentes étapes du diagramme de fabrication qui se ressemblent pour tous les échantillons. Ce diagramme est similaire à celui décrit par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011), et déduit des résultats des enquêtes réalisées dans la région Chaouia, au Nord-est d'Algérie.

Avant de procéder à la fabrication de *Bouhezza*, il faut d'abord la préparation de la *Chekoua*. Cette dernière est préparée à partir d'une peau de chèvre ou bien de brebis qui a subi un traitement spécial, comprenant, après la putréfaction, l'épilage et le lavage puis le traitement avec sel (NaCl) et le genièvre (21 jours à température ambiante). La *Chekoua* est obtenue après retournement de la face extérieure à l'intérieur et nouaison des extrémités postérieures (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2012).

La *Chekoua*, suspendue à l'ombre à l'air libre, est remplie avec du Lben de vache salé 20-25 g/l (ENASEL, Algérie), le niveau de remplissage de la *Chekoua* et la taille de celle-ci sont variables selon les familles. Au fur et à mesure qu'il y a égouttage de la *Chekoua*, des ajouts successifs de L'ben sont effectués. La fréquence des ajouts est relative à la disponibilité de Lben et à la vitesse de l'égouttage (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

Durant les derniers jours de la fabrication, des quantités du lait cru de vache sont ajoutés pour ajuster la salinité et l'acidité de fromage, puis le fromage est retiré de la *Chekoua* pour être préparé à la consommation.

Pour la plupart des familles, *Bouhezza* peut être assaisonné à la fin de sa fabrication par l'addition de piment rouge pilé « *Kalb el serdouk* » ou bien avec l'Hrissa. Certaines familles préfèrent le consommer sans épices.

2- Caractérisation physicochimique

3-1 Détermination du pH et de l'acidité

Le pH et l'acidité titrable sont deux mesures dont la première détermine les ions H^+ (acidité ionique), alors que la deuxième exprime la quantité d'acide lactique existant dans le fromage. Cependant, le résultat de l'acidité titrable exprime une acidité due en partie à la caséine, aux acides organique et aux substances minérales, en acide lactique.

Les mesures de pH et d'acidité renseignent sur le niveau de production d'acide lactique par les microorganismes lors de la préparation des laits fermentés et des fromages (NEVILLE et JENSEN, 1995)

Le pH des échantillons a été mesuré par un pH-mètre à électrode en verre (METTLER TOLEDO MP 230) selon la norme interne MET-L 026 du CoRFiLaC. Après la décongélation, les échantillons sont laissés à température ambiante comprise entre 17 et 25°C. Lorsque leur température devient environ +20°C, la couche supérieure (0.5 cm) est enlevée et jetée, puis ils sont homogénéisés en utilisant une spatule métallique, après l'étalonnage du pH-mètre, l'électrode est placée directement dans la masse de fromage. La mesure est répétée deux fois pour chaque échantillon.

Concernant l'acidité du fromage, une masse de 10g de ce dernier est placée dans un récipient en verre. Un volume de 40 ml d'eau distillée à 60°C est ajouté et mélangé à faible vitesse en utilisant le vortex, la suspension résultante est transférée dans un Erlenmeyer ; le récipient est rincé deux fois par 30 ml d'eau distillée à 60°C, l'eau de rinçage est ajoutée à la suspension. Cette dernière est centrifugée 10 minutes à 4000 rpm, le surnagent est récupéré dans une fiole jaugée et le volume est complété à 100 ml par l'eau distillée (APHA, 2004). Un volume de 50 ml est titré par une solution NaOH (0,1000N) en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré jusqu'au virage de couleur vers le rose qui doit persister 30 secondes.

L'expression des résultats est comme suit :

L'acidité titrable, exprimée en gramme d'acide lactique par cent grammes de fromage brut:

$$\text{Acidité titrable (g d'acide lactique /100g fromage)} = \frac{V_{\text{NaOH}} [\text{ml}] \times N [\text{mol/l}] \times 90.05 [\text{g/mol}]}{Z [\text{g}]}$$

V : Volume en millilitre de la solution de titration NaOH

N : Normalité de la solution de titration (NaOH)

90.05 : Masse moléculaire de l'acide lactique (CH₃CHOCOOH), exprimé en gramme/mole

Z : Masse en gramme de l'échantillon

3-2 Matière sèche

La matière sèche est l'un des paramètres les plus importants pour la caractérisation et la classification des fromages. Elle correspond au résidu sec obtenu après dessiccation dans l'étuve, à température égale à 100 ± 2°C pendant 24 heures (APHA, 2004).

Deux grammes sont pesés dans une coupelle en aluminium avec fond plat 5.7 cm de diamètre (VWR Aluminium Dish W/Tab 57 MM). La dessiccation a été réalisée dans une étuve à circulation d'air forcée (MEMMERT) réglée à 100 ± 2°C. La mesure est répétée quatre fois et le résultat est exprimé par la moyenne des quatre valeurs, plus au moins l'écart type.

Le résultat est calculé selon la formule suivante :

La matière sèche est exprimée en gramme par cent grammes du fromage brut:

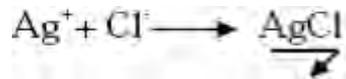
Matière sèche (g/100 fromage brut) =

$$\frac{(\text{Coupelle} + \text{résidusec}(\text{g}) - \text{coupelle vide}) \pm \text{moyenne de essai à blanc}(\text{g}))}{\text{coupelle} + \text{échantillon frais}(\text{g}) - \text{coupelle vide}(\text{g})}$$

3-3 Détermination de la teneur en sel (NaCl) dans le fromage

La teneur en sel est déterminée par la méthode de Volhard (APHA. 2004), le principe de cette méthode est basé sur la minéralisation de l'échantillon par l'acide nitrique concentré (HNO₃) puis une défécation de la matière organique restante (essentiellement les protéines)

par le permanganate de potassium (KMnO_4). En présence d'un excès de nitrate d'argent (AgNO_3) 0,1000N, les ions chlorure (Cl^-) de l'échantillon précipitent sous forme de chlorure d'argent (AgCl).



Après l'ébullition, l'excès en nitrate d'argent peut être rétro-titrer avec du thiocyanate de potassium 0,1000N en présence d'alun de fer ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \times 12\text{H}_2\text{O}$) comme indicateur.



L'alun de fer forme avec le thiocyanate un complexe rouge brique (complexe ferrithiocyanate)



3 g de fromage sont pesés avec une précision de 10^{-4} g et placés dans un Erlenmeyer. Un volume de nitrate d'argent (AgNO_3) à 0.1000N est ajouté pour précipiter tous les ions chlorures (Cl^-) présents dans le fromage. Le volume de nitrate d'argent dépend de l'âge de fromage : 20 ml pour les fromages de 1-2 mois d'affinage, 40 ml pour les fromages allant jusqu'au quatre mois d'affinage et 50 ml pour les fromages de 5 à 8 mois d'affinage, parce que la concentration en sel dans la pâte fromagère augmente au cours de temps.

15 ml d'acide nitrique concentré (65-69%) sont ajoutés, puis la solution est chauffée. A l'ébullition 15 ml de la solution saturée de permanganate de potassium sont additionnés. Quand la solution vire au jaune pâle avec un précipité blanc, le chauffage est arrêté et la solution est refroidit puis filtrée par un papier filtre Whatman 2V. Enfin l'excès en nitrate d'argent contenu dans le filtrat est titré par une solution de thiocyanate de potassium 0.1000N en présence de 2 ml d'une solution saturée d'alun de fer.

Expression des résultats

La teneur en sel, exprimée en gramme par cent grammes de fromage brut égale à :

$$\text{Sel (\%)} = \frac{(\%) \text{ sel non corrigé}}{(\%) \text{ sel du rétablissement}} \times 100$$

Sel non corrigé (%) =

$$\frac{M_{KSCN} \text{ (mol/l)} \times (KSCN \text{ essai à blanc (ml)} - KSCN \text{ échantillon (ml)}) \times 58.443 \text{ (g/mol)}}{Echantillon \text{ (g)}} \times 100$$

Sel du rétablissement (%) =

$$\frac{M_{KSCN} \text{ (mol/l)} \times (KSCN \text{ essai à blanc (ml)} - KSCN \text{ échantillon (ml)}) \times 58.443 \text{ (g/mol)}}{Standard \text{ (g)}} \times 100$$

Où

M_{KSCN} : Molarité de la solution de KSCN

$KSCN_{\text{échantillon}}$: Volume de KSCN en ml utilisé dans la détermination

$KSCN_{\text{blanc}}$: Volume de KSCN en ml utilisé dans la détermination

58.443 : Masse moléculaire de NaCl

Standard : Masse en gramme de NaCl

3-4 Dosage du taux de matière grasse

Le dosage de la matière grasse a été réalisé selon la méthode de Van Gulick conformément à la norme ISO 3433: 2008. Cette méthode est basée sur la digestion des constituants de fromage et principalement les protéines par de l'acide sulfurique (H_2SO_4), à l'exception la matière grasse, puis la séparation de cette dernière par centrifugation.

Trois gramme de fromage plus ou moins 0.1 mg sont pesés dans un godet adapté au butyromètre. Le godet est placé dans le butyromètre puis recouvert avec de l'acide sulfurique (densité 1.522 g/ml) jusqu'à l'immersion totale du godet et son contenu. Les butyromètres sont placés dans un bain d'eau à $65 \pm 2^\circ C$ sous agitation pendant 3 heures pour favoriser la dissolution totale de fromage. 1 ml d'alcool amylique (3-méthyle, 1-butanol) densité 0.818 g/ml est ajouté, puis les butyromètres sont remplis jusqu'à la graduation 25 ml avec de l'acide sulfurique (densité 1.522 g/ml). Après une agitation modérée, les butyromètres sont centrifugés à 1350 rpm pendant 10 minutes. Après la centrifugation, la lecture est effectuée immédiatement, La teneur en matière grasse, est exprimée en gramme par cent grammes de fromage brut. La mesure est répétée deux fois et le résultat est la moyenne des deux répétitions.

3-5 Dosage de l'azote total

La teneur en matière azotée totale a été déterminée selon la méthode KJELDAHL (ISO/TS 17837: 2008). Cette méthode est basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ par action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique et en présence d'un catalyseur de minéralisation ; il s'agit de sulfate de cuivre (II) penta hydrates $(\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O})$ et le sulfate de potassium pour augmenter le point d'ébullition. L'ammoniac est distillé et fixé dans une solution acide, après alcalinisation par la base forte (NaOH), la solution est titrée par de l'acide sulfurique.

Un gramme de *Bouhezza* est introduit dans un matras de minéralisation contenant 12g de sulfate de potassium, et 1 ml d'une solution de sulfate de cuivre (5%), puis 20 ml de l'acide sulfurique (densité 1.84 g/ml, 98% p/p) sont ajoutés. Une minéralisation est ensuite réalisée dans un bloc minéralisation par l'augmentation graduelle de la température jusqu'à 420°C et pendant environ 3 heures.

La distillation et la fixation de l'ammoniac est réalisée sur l'unité de distillation FOSS TECATOR 1002, où un volume de la base forte (NaOH à 40% p/p) égal à celui de l'acide sulfurique est ajouté.



L'ammoniac formé est entraîné par vapeur d'eau et récupéré dans un vase de titration contenant 50 ml de l'acide borique (4% p/v). Le borate d'ammonium formé est titré par une solution d'acide chlorhydrique ($\text{HCl } 0.1000 \pm 0.0005\text{M}$).

La détermination est effectuée en double et le résultat est exprimé par la moyenne des deux valeurs.

La teneur en azote total (NT) en g/100g de fromage est comme suit :

$$\text{NT}\% = \frac{14.007 \text{ (g/mol)}[\text{V HCl échantillon (ml)} - \text{V HCl blanc (ml)}] \times \text{M HCl (mol/l)}}{\text{Echantillon (g)} \times 1000} \times 100$$

14.007 : Masse moléculaire de l'azote

$\text{V}_{\text{HCl échantillon}}$: Volume en ml d'HCl nécessaire pour le titrage de l'échantillon

$\text{V}_{\text{HCl blanc}}$: Volume en ml d'HCl nécessaire pour le titrage blanc

M_{HCl} : Molarité de l'acide chlore hydrique utilisé pour le titrage

Echantillon : Masse de la prise d'essai

1000 : Facteur de conversion du millilitre vers le litre

Le contenu en protéines totales exprimé en gramme par cent grammes de fromage brut est obtenu en multipliant la teneur en azote total par 6.38. Dans les produits laitiers, on considère seulement la caséine où l'azote représente 15.7%, alors le facteur 6.38 est le résultat du rapport 100/15.7 (BARBANO, 1990).

3-6 Protéines soluble à pH 4,6

Le dosage des protéines solubles à pH 4.6 (la fraction azotée non caséique (ANC)) est très recommandé pour la caractérisation de la protéolyse des fromages affinés. La méthode de dosage est fondée sur la précipitation des caséines au point isoélectrique puis l'utilisation de la méthode KJELDAHL pour le dosage de l'azote du filtrat (BYNUM et BARBANO, 1985).

Une prise d'essai de $0.75 \pm 0.01\text{g}$ de fromage est solubilisée dans 50 ml de la solution tampon à pH 4.6 (acide acétique, acétate de sodium, chlorure de sodium et chlorure de calcium), puis homogénéisée pendant 30 secondes à vitesse faible. La suspension résultante est filtrée à travers un filtre Whatman 2V et le filtrat est récupéré dans un matras de minéralisation pour être dosée selon la méthode KJELDAHL. Chaque échantillon doit avoir deux répétitions et le résultat final est exprimé par leur moyenne.

Le contenu en protéines non caséique exprimé en pourcentage de poids (g/100g fromage brut) est obtenu en multipliant la teneur en azote résultante par le facteur 6.38.

4- Caractérisation du contenu lipidique

Dans cette étude, l'attention a été concentrée uniquement sur les acides gras ayant un intérêt nutritionnel spécial pour la santé humaine. Il s'agit des acides linoléique, linoléique et linoléique conjugué. Ce choix est justifié pour deux raisons, la première est d'évaluer leur concentration dans le fromage *Bouhezza* en vue de sa caractérisation. La deuxième est de montrer la valeur nutraceutique de *Bouhezza* qui peut être considéré comme un aliment fonctionnel en vue de sa protection.

4-1 Evaluation du contenu en acides gras

4-1-1 Extraction des acides gras y compris les isomères de l'acide linoléique conjugué (ALC)

Les lipides totaux sont extraits à partir des échantillons de fromage selon la méthode de FOLCH *et al.* (1957). Ils ont été saponifiés selon la méthode décrite par BANNI *et al.* (1996) dont le but est d'obtenir les acides gras libres (AGL) pour les analyses en HPLC (figure 7). Les manipulations nécessitent une attention particulière à chaque étape de l'analyse pour éviter les températures supérieures à 25°C et l'exposition excessive à l'air et à la lumière afin d'empêcher l'oxydation des échantillons. Tous les réactifs utilisés sont HPLC-grade (CARLO ERBA Reagenti-Spa, Italie).

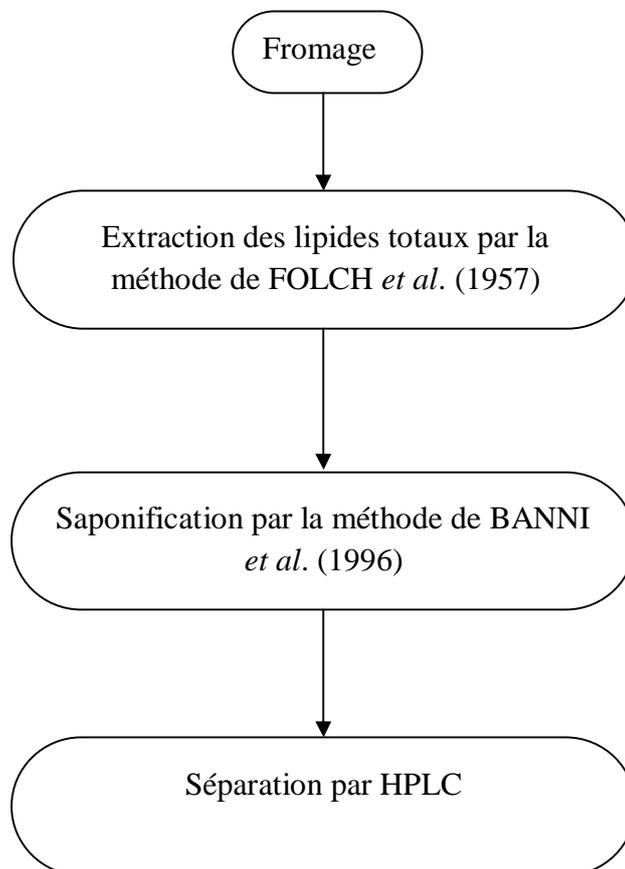


Figure 7 : Méthodes utilisées pour l'évaluation du contenu en acides gras dans les échantillons de *Bouhezza*.

La méthode de FOLCH est basée sur l'utilisation des solvants organiques (chloroforme/méthanol) pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires. Après centrifugation, un système biphasique est obtenu : une phase surnageante contenant tous les composés non-lipidiques, et une phase organique contenant la quasi-totalité des lipides.

Une masse de 0.3 ± 10^{-6} g de fromage est pesée en utilisant la balance analytique SARTORIUS Mc 210S (10^{-6} de précision), puis solubilisée dans 12 ml de la solution FOLCH : Chloroforme (CHCl_3) et méthanol (MeOH) avec un rapport 2:1 (v/v), soit 8 ml de CHCl_3 et 4 ml de MeOH. Pour éviter les phénomènes d'oxydation, 200 μl de la vitamine E (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont ajoutés. Le mélange est agité 30 secondes par le vortex, puis entreposé à l'obscurité pendant une heure.

4 ml d'eau distillée sont ajoutés et le mélange est agité à nouveau délicatement par le vortex, puis laissé à l'obscurité. Après une heure, il est centrifugé 10 minutes à 4500 rpm à environ 10°C pour faciliter la séparation de la phase chloroformique de celle méthanol-eau.

Après la séparation des deux phases, la phase supérieure (méthanol-eau) et l'interface sont complètement enlevées par une pipette. A partir de la phase chloroformique résiduelle, 4 ml sont prélevés pour l'extraction des acides gras libres par saponification.

4-1-2 Saponification

Les lipides totaux extraits sont solubilisés dans 5 ml d'éthanol absolu, un volume de 200 μl de la vitamine E (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est ajouté afin d'éviter l'oxydation.

La saponification est réalisée par l'ajout de 100 μl de la solution de Desferal (2.5% m/v), comme agent chélateur des métaux, 1.0ml de l'acide ascorbique (solution à 25% m/v) et 500 μl de KOH (solution 10N). Le mélange est agité 30 secondes par le vortex et laissé à l'obscurité 14 heures approximativement.

Les acides gras libres sont extraits par l'ajout de 10ml de n-hexane et 7ml d'eau distillée, en acidifiant le milieu par l'acide chlorhydrique l'HCl 37% (v/v), approximativement 380 μl jusqu'au pH 3-4. Ensuite, le mélange est agité une minute par le vortex ; puis centrifugé 10 minutes à 1500rpm et à 10°C .

Après la séparation des deux phases, les tubes contenant les échantillons sont refroidis par la glace. A partir de la phase hexanique (supérieure) contenant les acides gras, deux

volumes ont été prélevés et transférés dans deux nouveaux tubes de Pyrex, 4.5 ml pour la lecture des acides gras polyinsaturés (acide linoléique et acide linoléique) et 5ml pour la lecture des isomères d'ALC.

Pour la lecture des acides gras polyinsaturés, L'hexane est évaporé sous vide à 40°C en utilisant un rotavapor BUCHI R-3000, puis le résidu obtenu est solubilisé dans 500µl d'acétonitrile (CH₃CN) contenant (0.14% v/v) d'acide acétique (CH₃COOH), filtré par un filtre Millipore (Millipore Direct Q-UV3.25µm, France), et récupéré dans une capsule de lecture spéciale à l'HPLC.

Concernant la lecture des isomères d'ALC, l'hexane est évaporé sous vide à 40°C dans le rotavapor, puis le résidu obtenu est solubilisé dans 1 ml une solution de Boro-Ti-fluoride-Méhanol (BF₃.CH₃OH : 14% m/v) et agité une minute (vortex). Ensuite, 4 ml de n-hexane et 3 ml d'eau distillé sont ajoutés, le mélange est agité une minute par le vortex et entreposé 5 minutes pour la séparation des phases. La phase hexanique (supérieure) est ensuite pipetée et transférée dans un nouveau tube de Pyrex, tandis que, la phase résiduelle est agitée à nouveau avec 4 ml d'hexane une minute par le vortex. Après la séparation des phases, la phase hexanique est pipetée et additionnée à la précédente. Après avoir récupéré les deux phases, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés, puis le mélange est agité une minute par le vortex. Après centrifugation 10 minutes à 1500rpm à 10°C, la phase hexanique (environ 7.3 ml) est entièrement prélevée et transférée dans un nouveau tube de Pyrex par une pipette. Enfin, l'hexane est évaporé sous vide à 40°C en utilisant le rotavapor, puis le résidu obtenu est solubilisé dans 500µl de n-hexane et récupéré dans la capsule de lecture pour l'HPLC.

La séparation des acides gras polyinsaturés (AGPI) et monoinsaturés (AGMI) a été réalisé par la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) en utilisant le système HPLC (Water 2695, USA) et la colonne SB-C18 (5 µm taille de particule, 4.6 mm ID × 250 mm, Agilent Zorbax). Tandis que, la séparation des isomères de l'acide linoléique conjugué (ALC) en tant qu'acides gras libres a été réalisée par la chromatographie liquide haute performance Ion-argent en utilisant le même système HPLC et deux colonnes en série ChromoSher 5 liquid (5 µm taille de particule, 34.6 ID× 250 mm, Chrompack International BV, Middelburg, Netherlands).

4-1-3 Description du système HPLC utilisé

Le système HPLC utilisé au cours des analyses est constitué par un module de séparation (Waters 2695, USA) (Figure 8), la pompe représente une plateforme intégrée de gestion des solvants et des échantillons. Ce module est équipé d'un système d'auto-échantillonnage grâce à une seringue, et d'un dégazeur intégré. Ce module comporte deux détecteurs : Dual λ Absorbance ultraviolet (Waters 2487, USA) et fluorescence Waters 2475 (USA), et une ou deux colonnes selon l'analyse effectuée. L'ensemble de ces composants est commandé par un microordinateur utilisant le logiciel « Empower service pack 2 ».

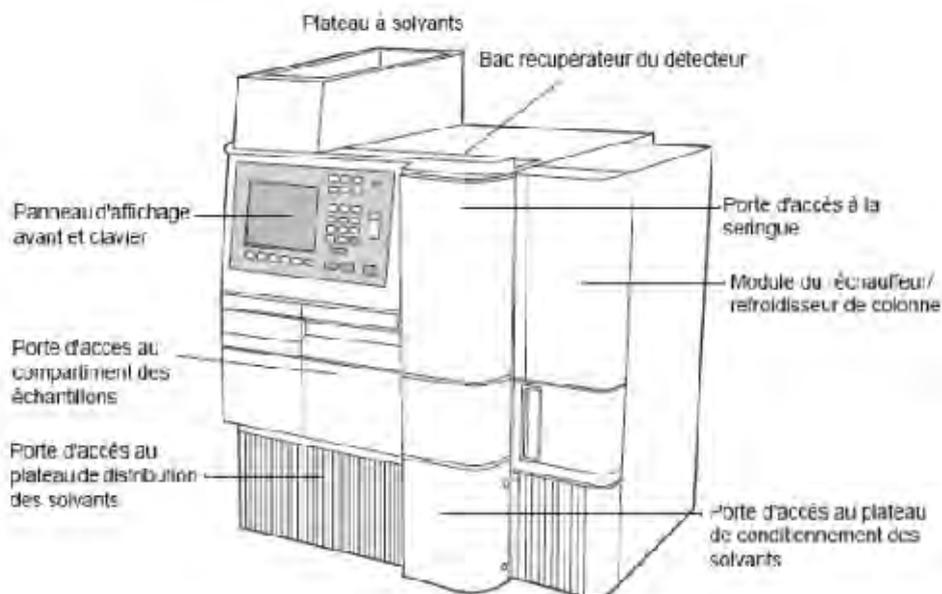


Figure 8 : Vue de face du module de séparation Waters 2695

Source : (Module de séparations 2695 de Waters. *Manuel de l'utilisateur Révision-B*. Waters Corporation 2008-2010).

Le système de gestion des solvants (Figure 9) comporte une vanne proportionnante qui mélange les solvants. Les solvants mélangés traversent le clapet anti-retour puis pénètrent dans la chambre du piston primaire. Le piston accumulateur distribue le solvant sous pression au transducteur de mesure de la pression du système. Juste avant de vider la chambre du piston accumulateur, le solvant contenu dans la chambre du piston primaire est précomprimé à une pression légèrement inférieure à celle indiquée par le transducteur de mesure de la pression du système.

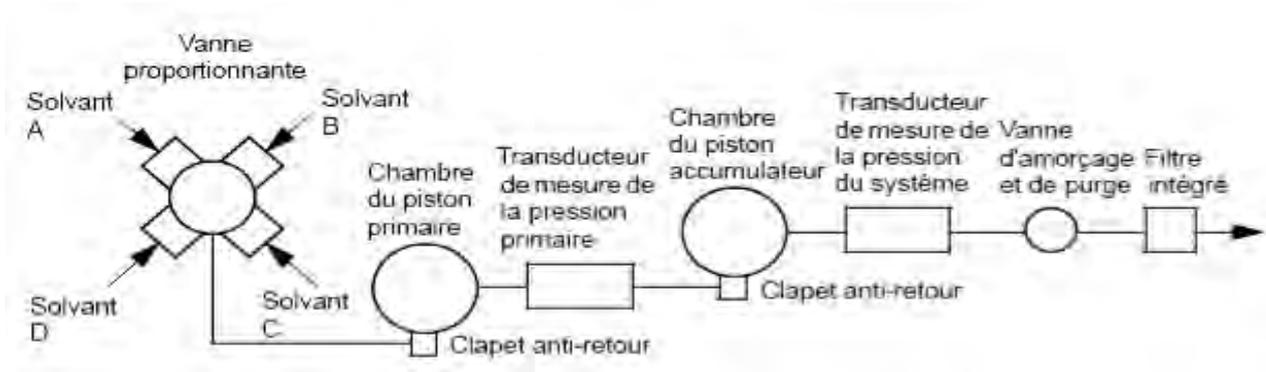


Figure 9 : Circuit fluidique dans le système de gestion des solvants

Source : (Module de séparations 2695 de Waters. *Manuel de l'utilisateur Révision-B*. Waters Corporation 2008-2010).

Le système de gestion des échantillons contient les flacons des échantillons, il les positionne puis injecte les échantillons dans le flux de solvant. Les cinq carrousels du système peuvent contenir 24 flacons d'échantillon chacune, soit 120 flacons au total. Les flacons sont des flacons standards de 2 ml, munis de capuchons à pression, sertis ou à vis. Un porte-carrousels rotatif place les carrousels sur le poste d'injection, dans le compartiment des échantillons. La circulation du solvant, de l'échantillon et du solvant de lavage de l'aiguille est commandée par quatre vannes dans le système de gestion des échantillons. Ces vannes, nommées V1 à V4, sont illustrées la figure 10 ci-dessous.

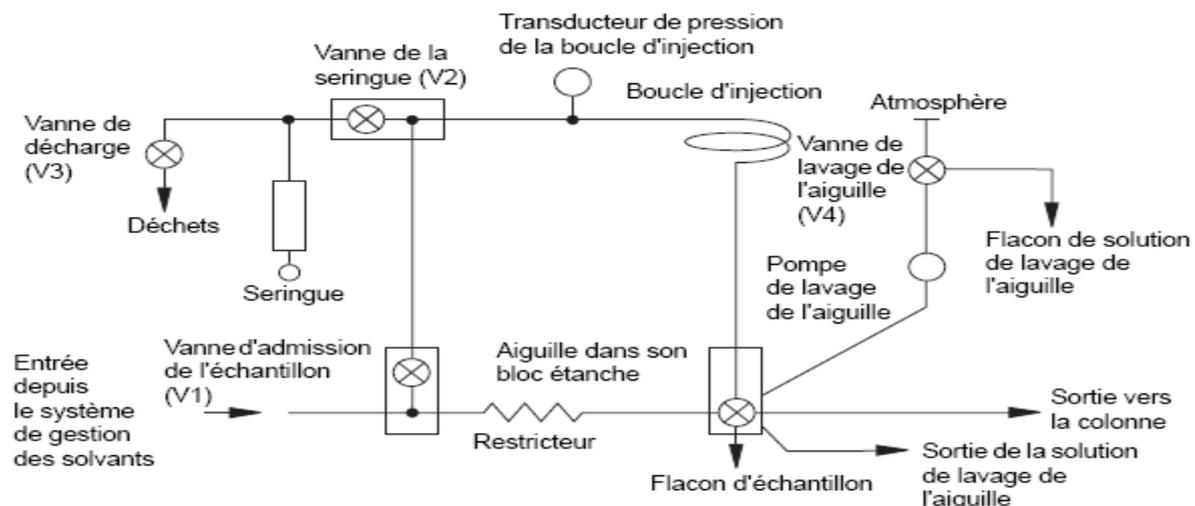


Figure 10 : Circuit fluidique à travers le système de gestion des échantillons

Source : (Module de séparations 2695 de Waters. *Manuel de l'utilisateur Révision-B*. Waters Corporation 2008-2010).

4-1-4 Séparation acides gras polyinsaturés

Avant l'injection des échantillons dans la colonne, le système HPLC doit être préalablement équilibré. La seringue est lavée automatiquement avant et après chaque injection par la phase mobile utilisée en élution. Cette dernière est pompée à travers la colonne avec l'augmentation graduelle du débit jusqu'au débit choisi. La pression au débit choisi doit être stable, sinon l'utilisation du dégazeur est nécessaire. La température est aussi un paramètre qui doit être stable au cours de la détermination.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) et monoinsaturés (AGMI) ont été séparés par la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) en utilisant le système HPLC Waters 2695, la colonne SB-C18 (4.6 mm ID × 250mm, 5µm taille de particule, Agilent Zorbax, USA), cette colonne est apolaire, 4.6 mm représente le diamètre de la colonne, 250 mm est sa longueur. 50 µl de chaque échantillon est injecté à travers la colonne parcourue par la phase mobile polaire constituée par le mélange acétonitrile/eau/acide acétique : CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (70/30/0.12, v / v / v) pompée à un débit d'élution isocratique de 1.5ml/min. Les acides gras insaturés non conjugués ont été détectés à 200 nm par un détecteur dual λ Absorbance ultraviolet (Waters 2487, USA).

4-1-5 Séparation des ALC

La séparation des isomères de l'acide linoléique conjugué (ALC) en tant qu'acides gras libres a été réalisée par la chromatographie liquide haute performance Ion-argent en utilisant le même système HPLC et deux colonnes Ion-argent en série, il s'agit de la colonne ChromoSpher 5 lipid Chrompack (5 µm taille de particule 4.6 mm ID × 250 mm, Chrompack International BV, Middelburg, Netherlands). Le volume d'injection est de 50 µl, la phase mobile est constituée par le mélange hexane/acétonitrile/acide acétique (CH₃(CH₂)₄CH₃/CH₃CN/CH₃COOH) (97/0.037/2.5 v / v / v) à un débit d'élution isocratique de 1 ml / min. Les isomères d'ALC ont été détectés à 234 nm avec un détecteur dual λ Absorbance ultraviolet (Waters 2487, USA). Les conditions dans quels nous avons réalisé la séparation des ALC se ressemblent à ceux décrits par ADLOF. (2003) et PILAR *et al.* (2006).

4-2 Vitamines liposolubles

4-2-1 Extraction de la vitamine E et de la bêta-carotène

Parmi les vitamines liposolubles se trouvant dans le fromage *Bouhezza*, on s'intéresse uniquement à ceux ayant un caractère antioxydant, il s'agit du Bêta-carotène et l'alpha-tocophérol.

L'extraction du β -carotène et de l' α -tocophérol a été réalisée sur les échantillons de fromage dégelés. Chaque étape de l'analyse a été effectuée dans l'obscurité pour éviter des réactions d'oxydation. L'extraction de la β -carotène et la vitamine E a été réalisée sur 0.5 g de chaque échantillon de fromage selon PALOZZA et KRINSKY (1992) et MARINO *et al.* (2010) respectivement. Le matériel utilisé est HPLC-grade (CARLO ERBA Reagenti-Spa, Italie).

D'abord deux prises d'essai de $0,5 \pm 10^{-6}$ g de fromage sont pesées en utilisant la balance (SARTORIUS Mc 210S, 10^{-6} de précision), puis solubilisé dans 2 ml d'éthanol (99.5% v/v) contenu (0,5% p/v) de Butyrate hydroxytoluène (BHT) pour stabiliser l'échantillon vis-à-vis l'oxydation. Après une agitation de 30 secondes (vortex), 1 ml de KOH (10% p/v) est ajouté à l'échantillon destiné à l'extraction de la vitamine E, et 1ml de KOH (60% p/v) est ajouté à l'échantillon destiné à l'extraction de la bêta-carotène. Les tubes contenant les échantillons sont agités délicatement 30 sec, purgés avec de l'azote et recouverts, puis incubés dans un bain marie munie d'agitation (Grant OLS 200) pendant 30 min à 70°C et dans l'obscurité. Durant l'incubation les tubes sont agités 30 sec chaque 10 minutes (vortex). Après l'incubation, deux extractions successives par l'hexane ont été réalisés, 5 ml d'hexane sont ajoutés à chaque échantillon, puis le mélange est centrifugé à 1500rpm pendant 10 minutes à 10°C, la phase hexanique (supérieure) est transférée doucement dans un nouveau tube de Pyrex propre par une pipette. Tandis que, la phase résiduelle est mélangée avec 5 ml d'hexane puis centrifugée à nouveau dans les mêmes conditions, la phase hexanique résultante est récupérée et additionnée à la précédente. Enfin, l'hexane est évaporé sous-vide à 40°C dans le rotavapor (BUCHI R-3000). Le résidu obtenu est remis en solution dans 500 μ l du méthanol absolu (100% v/v) pour la séparation par l'HPLC.

4-2-2 Séparation par l'HPLC

La chromatographie utilisée pour les deux molécules est la chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC). Nous avons utilisé le système HPLC (Waters 2695, USA) équipé avec deux détecteurs, il s'agit de Dual λ absorbance ultraviolet (Waters 2487, USA) et Multi λ fluorescence (Waters 2475, USA). Pour chaque molécule, une courbe d'étalonnage a été établie par l'utilisation des étalons externes.

La phase mobile polaire composée de méthanol absolu pour α -tocophérol et est le mélange acétonitrile/méthanol/isopropanol 60:30:10 (v/v/v) contenant (0.01% p/v) d'acétate d'ammonium pour β -carotène est pompée à travers la colonne chromatographique apolaire SB-C18 (5 μ m taille de particule, 4.6 mm ID \times 250 mm, Agilent Zorbax) à un débit d'élution isocratique de 1.2 ml/min. Lorsque le système HPLC devient stable, un volume de 50 μ l de chaque échantillon est injecté dans la colonne. Pour l' α -tocophérol, la lecture des pics, est réalisée en utilisant le détecteur Multi λ fluorescence (Waters 2475, USA) fixé à une longueur d'onde d'excitation de 297 nm et une longueur d'onde d'émission de 340 nm, tandis que pour le β -carotène, nous avons utilisé le détecteur d'absorbance UV (Waters 2487, USA) fixé à une longueur d'onde visible de 450 nm.

Résultats et

Discussion

1- Caractéristiques physico-chimiques du fromage *Bouhezza*

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur les échantillons de fromage sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (tableau 4):

Tableau 4: Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de *Bouhezza*.

Paramètres physicochimiques	Echantillons de fromage <i>Bouhezza</i>					
	F1E	F2SE	F3E	F4SE	F5E	F6SE
pH	3.8	4.2	4.1	3.9	3.7	3.8
Acidité*	5.4	5.5	5.3	4.3	5.6	5.5
Matière grasse**	9.0	5.5	8.8	10.5	9.8	9.5
Sel**	2.1	1.8	2.3	2.3	1.7	2.3
Extrait Sec Total**	25.7± 0.05	22.9±0.22	26.9±0.15	26.9±0.12	26.7±0.03	27.4±0.10

*: g d'acide lactique par cent g de matière sèche. **: g de NaCl par cent g de fromage brut.

Valeurs moyennes des deux essais (pH, acidité, matière grasse, teneur en sel).

Valeurs moyennes ± écart type (quatre essais pour extrait sec total)

1-1 pH et acidité titrable

D'après ces résultats, le pH du *Bouhezza* traditionnel est compris entre 3.7 et 4.2 avec une moyenne de 3.91 ± 0.19 . Ce résultat est similaire à celui signalé par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011). Selon ces auteurs, le pH de *Bouhezza* reste autour de 4 durant dix semaines de d'affinage.

Le pH de *Bouhezza* est légèrement inférieur aux pH des fromages *Tulum* et *Darfiyeh* fabriqué en Turquie et en Liban successivement (HAYALOGLU *et al.*, 2007 ; SERHAN *et al.*, 2010). Il est aussi inférieur à d'autres fabriqués dans la peau à Croatie, Bosnie, Herzégovine, Monténégro et Turquie (KALIT *et al.*, 2010). Ces fromages sont fabriqués par le lait cru de vache, chèvre ou brebis puis affinés dans la peau de chèvre d'un à plusieurs mois. Le pH acide de *Bouhezza* peut être expliquée par son mode de fabrication marqué par l'ajout successif de Lben, ce dernier est caractérisé par un pH acide d'environ 4.84 ± 0.05 (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

La teneur en acide lactique des échantillons de *Bouhezza*, est entre 1.15 à 1.49 gramme pour cent gramme de *Bouhezza* brut soit 4.3 à 5.6 g d'acide lactique pour cent g de matière sèche. Selon AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011), le contenu en acide lactique dans le fromage *Bouhezza* augmente significativement au cours de l'affinage (coefficient de variation $r = 0.77$),

à partir de 0.84g/ml de *Lben* jusqu'à 3.08 g/100g de matière sèche. Cette augmentation suggère que l'acidification empêche le développement des bactéries qui oxydent l'acide lactique et permettent la neutralisation du caillé. En plus, les ajouts successives du *Lben* enrichi régulièrement le caillé en bactéries d'acidification lactique.

1-2 Matière grasse

La teneur en matière grasse des échantillons de *Bouhezza* est variable, elle passe de 5.5 à 10.5 g pour cent g de fromage, ce qui correspond à 24.02 et 39.03 g par cent g de matière sèche. Selon AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011), et AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), la teneur en matière grasse/extrait sec total de *Bouhezza* après dix semaine de fabrication est de 30, 40% successivement. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par ces auteurs.

La variation de la teneur en matière grasse entre les différents échantillons de fermes pourrait être au degré d'écémage au cours de la préparation de *Lben* utilisé pour la fabrication et aussi au procédé de fabrication. C'est seulement à la fin de fabrication que les familles ajoutent une petite quantité du lait cru.

La teneur en matière grasse dans le fromage *Bouhezza* est inférieure à celle des fromages affinés dans la peau de chèvre fabriqués à Croatie, Bosnie, Herzégovine, Monténégro, Turquie et Liban (KALIT *et al.*, 2010 ; SERHAN, 2008). Cette différence est justifiée car ces fromages sont fabriqués à partir de lait cru entier. Cependant, le *Bouhezza* est fabriqué est principalement avec le *Lben*, en plus sa préparation et son affinage sont totalement réalisés dans la *Chekoua*. L'ajout du lait cru se fait à dernière semaine de fabrication.

D'autre part et selon la littérature, la teneur en matière grasse dans le fromage *Bouhezza* est faible si on la compare avec d'autre fromages comme : *Danish havarti* 46.9% g pour cent g de matière sèche, *Tilsiter* 46%, *Coulommiers* 46.8%, *Cheddar*, *Gouda*, *Blue* et *Brie* entre 42 et 56% (GUINEE et MCSWEENEY, 2006)

1-3 Extrait sec total

Des valeurs de l'extrait sec total comprises entre 22.9 et 27.4% sont notées. Ces teneurs sont inférieurs à ceux rapportés par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011) et AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), qu'ils ont trouvés que l'extrait sec total de *Bouhezza* évolue durant sa fabrication ($r = 0.92$), il varie de 20.77g/100g pendant la première semaine à 35.86% vers la

fin de l'affinage c'est-à-dire après dix semaines. Cette augmentation est due à l'ajout régulier de Lben et du lait cru accompagné par l'exsudation (égouttage) en continu du lactosérum à travers les perforations naturelles de la *Chekoua* tout le long de la fabrication.

La différence en extrait sec total entre les échantillons peut être due à la variabilité de l'extrait sec de *Lben* utilisés pour la préparation des échantillons, la fréquence et la quantité des ajouts de Lben et la vitesse de l'égouttage. Cette dernière est en relation avec la qualité de la *Chekoua*. La vitesse est maximale si la *Chekoua* est utilisée pour la première fois.

1-4 Taux de sel (NaCl)

La teneur en sel varie considérablement entre les six échantillons. Elle passe de 1.7 à 2.3% (soit 17 à 23 g NaCl.kg⁻¹). Ces résultats sont légèrement inférieurs à ceux trouvés par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), selon ces auteurs, le *Bouhezza* de 21, 42 et 70 jours a un taux de NaCl de 2.21, 3.03 et 2.98 successivement. Selon ALIAS et LINDEN (1997) et FOX *et al.* (2000), la plupart des fromages ont un taux en sel de 10 à 20 g.kg⁻¹. Les six échantillons de *Bouhezza* présentent des teneurs en sel similaires à la teneur signalée.

La teneur en sel de *Bouhezza* est inférieure à celle des fromages affinés dans la peau de chèvre fabriqués à Croatie, Bosnie, Herzégovine, Monténégro et Turquie (KALIT *et al.*, 2010). Cette différence pourrait être due à l'opération de salage, réalisée avant l'introduction de la pâte fromagère dans la peau de chèvre. Tandis que, pour le fromage *Bouhezza* cette opération s'effectue directement par l'ajout de sel au *Lben*.

1-5 Taux d'azote et ses fractions

La fraction d'azote non caséinique (ANC) est utilisée avec la fraction d'azote non protéique (ANP) pour déterminer la nature de la protéolyse. La première fraction donne l'information sur l'activité des protéinases et caractérise l'affinage en longueur (dégradation des caséines vers des fragments solubles dans l'eau), alors que, la deuxième est liée à l'activité des peptidase et caractérise l'affinage dans sa profondeur (dégradation de l'ANC vers des fragments plus petits) (SERHAN, 2008).

Le taux d'azote et la fraction d'azote non caséinique sont représentés dans le tableau suivant (tableau 5):

Tableau 5 : Fractions azotées des échantillons de *Bouhezza*.

Fractions azotées	Echantillons de fromage <i>Bouhezza</i>					
	F1E	F2SE	F3E	F4SE	F5E	F6SE
Azote total*	1.7	2.1	2.2	1.8	1.8	2.0
Taux de protéines*	10.7	13.6	13.8	11.3	11.4	12.7
Protéines solubles à pH 4,6 (ANC)**	8.3	7.4	15.7	7.8	10.4	7.4

*: g par cent g de fromage brut. **: en g par cent g d'azote total.

Valeurs moyennes des deux essais pour toutes les mesures

D'après le tableau 5, le taux d'azote total dans les six échantillons de fromage est variable, il est compris entre 1.7 et 2.2%, ce qui correspond à des taux en protéines de 10.7 à 13.8%. Selon AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), la teneur en protéines de *Bouhezza* 42 jours d'affinage est de 12.4%, après dix semaines, elle devient 16.80% (15.47% pour le *Bouhezza* épicié). De point de vue affinage, nos résultats sont comparables à la valeur trouvée après 42 jours sachant que nos échantillons ont seulement 30 jours d'affinage.

La teneur en protéines du *Bouhezza* est faible par rapport aux fromages affinés dans la peau de chèvre fabriqués à Croatie, Bosnie, Herzégovine, Monténégro et Turquie (KALIT, *et al.*, 2010). La coagulation de ces fromages est enzymatique (par la présure), tandis que celle de *Bouhezza* est lactique, ce qui provoque une exsudation très importante du lactosérum et par conséquence une perte considérable en protéines.

La fraction de l'azote soluble à pH 4.6 dans l'azote total est souvent utilisée comme indicateur de la maturation des fromages (REVILLE et FOX, 1978 ; BYNUM et BARBANO, 1985 ; LABORDA et RUBIOLO, 1999 ; GOROSTIZA *et al.*, 2004). Le taux de maturation des échantillons varie de 7.4 à 15.7%. Selon les résultats trouvés par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), le taux en protéines solubles à pH 4.6 est très important durant la première semaine de fabrication (environ 15%), suivi par une diminution considérable vers 42 jours, puis il augmente significativement après les ajouts du lait cru (environ 11% à la fin de fabrication). A l'exception des fromages épiciés F3E et F5E, nos résultats sont inférieurs par rapport aux valeurs cités précédemment. SAOUDI. (2012) a trouvé que le taux de maturation augmente avec l'âge de l'affinage, il passe de 8.49% à 45 jours à 16.23% à 120 jours d'affinage pour différents échantillons de *Bouhezza* de ferme. Selon la littérature, le *Darfiyeh* (fromage affiné dans la peau de chèvre fabriqué au Liban) est caractérisé par un taux de protéolyse qui varie entre 17 et 20% après deux mois d'affinage (SERHAN *et al.*, 2010), le *Camembert* d'un mois

d'affinage, a 15 à 17% de maturation en surface (MICHALSKI *et al.*, 2003) et environ 9 à 12% seulement dans le cœur (SOUSA et MCSWEENEY, 2001), le *Cheddar* présente des valeurs entre 20 et 25% après quatre mois d'affinage (REHMAN et FOX, 2002 ; BARRETT *et al.*, 1999), le *Gorgonzola* présente des taux qui peuvent aller jusqu'à 43 à 46% (ZAMPOUTIS *et al.*, 1997). A travers cette littérature, nous constatons que la protéolyse de *Bouhezza* à 30 jours d'âge dans la *Chekoua* est peu importante, cela probablement due au procédé de fabrication marqué par l'absence de l'utilisation des protéases et des ferments sélectionnées. La protéolyse est due essentiellement à l'activité des enzymes du lait cru et de la flore microbienne originelle.

La protéolyse de *Bouhezza* ne peut se faire que par les enzymes natives du lait (essentiellement la cathepsine D et la plasmine), et aussi par les protéases endogènes apportées par les microorganismes. Le pH optimum d'activité de la cathepsine D est 4 (FOX *et al.*, 2000 ; MCSWEENEY, 2011), c'est le pH enregistré pour le *Bouhezza*. Selon FOX et MCSWEENEY. (1996), les différences de la teneur en azote soluble sont dues à des différences de l'humidité, température, pH et durée de maturation. Selon SAOUDI. (2012), la protéolyse primaire des caséines de *Bouhezza* de ferme par les protéinases du lait et/ou sa microflore, permet de donner différents fragments caséiniques insolubles à pH 4.6 détectés par l'électrophorèse de la fraction azotée insoluble à pH 4.6 sur gel de polyacrilamide en présence d'urée (PAGE-Urée).

A travers les résultats obtenus par la mesure des différents paramètres physicochimiques, le fromage *Bouhezza* est caractérisé par une humidité comprise entre 73 et 77%, un pH compris entre 3.7 et 4.2, un taux de matière grasse entre 6 et 11% et une teneur en sel de 1.8 à 2.3%. Selon la classification du codex alimentarius FAO/OMS, (2007) *Bouhezza* fabriqué à base de lait de vache (30 jours d'affinage) peut être défini comme étant un fromage à pâte molle migras, avec un extrait sec total dégraissé (E.S.T.D) de 67% et un taux de matière grasse/extrait sec total (MG/EST) d'environ 30%. C'est la même classification donnée par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011) pour le *Bouhezza* du lait de vache, dix semaines d'affinage.

2- Caractéristiques de la fraction lipidique du *Bouhezza*

2-1 Contenu en acide gras polyinsaturés

2-1-1 Acide linoléique et acide linoléinique

La concentration en acides gras polyinsaturés (AGPI) dans le lait est environ 2 g/l, et les AGPI principaux du lait sont l'acide linoléique (18:2 oméga-6) et l'acide alpha-linolénique (18:3 oméga-3). Ces deux acides gras peuvent être convertis en acides gras avec 20 atomes de carbone soit l'acide arachidonique (20:4 oméga-6) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (20:5 oméga-3), et encore converti aux eicosanoïdes ; composés métaboliquement très actifs avec des fonctions locales (HAUG *et al.*, 2007). Dans les fromages, cette concentration est variable et dépend de la concentration initiale dans le lait et du procédé de fabrication.

Le contenu en acide linoléique et α -linoléinique dans les échantillons de fromage *Bouhezza* est récapitulé dans le tableau suivant (tableau 6):

Tableau 6 : Contenu en acide linoléique et linoléinique dans le fromage *Bouhezza*.

	Echantillons de <i>Bouhezza</i> *					
	F1E	F2SE	F3E	F4SE	F5E	F6SE
AL ¹ (g/100g MG ³)	6.4	2.6	8.5	8.0	12.0	9.4
AL (mg/100g Fromage)	574.2	145.7	747.1	838.9	1184.8	889.2
ALN ² (g/100g MG)	1.4	1.3	2.0	1.7	2.8	1.7
ALN (mg/100g Fromage)	123.1	69.9	176.0	177.8	276.8	161.1
AL/ALN	4.8	2.0	4.2	4.7	4.3	5.5
CLA total (g/100g MG)	0.07	0.15	0.11	0.09	0.11	0.09
CLA total (mg/100g Fromage)	5.9	8.3	9.5	9.9	11.2	8.3

* : Chaque échantillon a été analysé en double et le résultat est exprimé en moyenne. ¹ : Acide linoléique. ² : Acide α -linoléinique. ³ : Matière grasse de fromage.

La concentration en acide linoléique dans les échantillons de *Bouhezza* est variable, avec des teneurs comprises entre 26 et 120 mg/gramme de matière grasse, ce qui correspond à 145.7 et 1184.8 mg/100g de fromage. Dans la plupart des études réalisées sur les fromages, la concentration en acide linoléique a été exprimée en pourcentage par rapport aux acides gras totaux. Pour cette raison la comparaison de nos résultats avec d'autres fromages reste très limitée. A l'exception de l'échantillon F2SE, la teneur en acide linoléique est supérieure à celle trouvée par LUCAS *et al.* (2006) dans le fromage Abondance (pâte pressée mi-cuite, lait

de vache), Tomme de Savoie (pâte pressée non cuite, lait de vache), Salers/Cantal (pâte pressée non cuite, lait de vache) et Racamadour (coagulation lactique, lait de chèvre).

De même, la concentration en acide linoléique du *Bouhezza* est variable, avec des teneurs comprise entre 69.9 et 276.8 mg/ 100g de fromage. Cette valeur est similaire à certains fromages Turcs (SEÇKIN *et al.*, 2005). A noté que le *Bouhezza*, produit à partir de *Lben* (lait fermenté partiellement écrémé) contient en moyenne, seulement 10% de l'acide linoléique par rapport aux fromages alpestres produits par le lait cru entier (HAUSWIRTH *et al.*, 2004).

La variation de la concentration en acide linoléique dans les échantillons de *Bouhezza* peut être attribuée à la qualité du lait et au procédé de fabrication. En fait, HAYALOGU *et al.* (2007) ont rapporté que la composition de fromage Turc « *Tulum* » est affectée par le sac de peau de chèvre où il est affiné. D'ailleurs, GUN et SIMSEK, (2011) ont rapporté que l'estomac de chèvre ou de brebis utilisé comme un récipient naturel pour la conservation du Beurre « *Karinyagi* » influe la composition en acides gras du beurre. AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011) ont rapporté que la flore lipolytique du *Bouhezza* est très importante. Ainsi, nous pouvons mettre l'hypothèse que la peau de chèvre « *Chekoua* » influe la composition en acides gras du fromage *Bouhezza*.

Le ratio des acides gras polyinsaturés oméga 6/oméga 3 dans les produits laitiers est compris entre 4 à 2 (MCLNTOSH G *et al.*, 2006). Dans la présente étude le ratio de l'acide linoléique (oméga 6)/l'acide α -linoléique (oméga 3) était entre 2.0 et 5.5 avec une moyenne de 4.25. Cette teneur est assez importante d'un point de vue nutritionnel, car malgré la faible teneur en matière grasse du fromage *Bouhezza* (fromage mi gras) cette matière est de bonne qualité.

Selon l'Autorité Européenne de la sécurité alimentaire (EFSA). (2009), l'apport journalier de référence pour la population générale en acide linoléique est 10g/jour. Dans cette étude, 100g de *Bouhezza* dans un régime contribuerait en moyenne, à 7.3% de l'apport journalier recommandé en acide linoléique. SIMOPOULOS *et al.* (2002) ont rapporté que l'apport adéquat en acide linoléique (oméga 6), pour les adultes est 4.44g/jour. Considérant cette valeur, 100g de *Bouhezza* dans un régime contribuerait en moyenne, à 16.44%.

L'acide linoléique présente un intérêt nutritionnel parce qu'il semble avoir un rôle protecteur dans les préventions primaires ou secondaires des accidents cardiovasculaires mortels (SIMOPOULOS, 2002). Selon les directives de l'association américaine du Cœur

2003, une prise minimum de 1.5g/jours en acide linoléique semble avoir des effets cardioprotectifs (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2003). D'après nos résultats, 100g de *Bouhezza* dans un régime contribuerait en moyenne, à 3% de l'apport diététique recommandé en acide linoléique pour un homme adulte.

2-1-2 Acides linoléique conjugués (ALC)

Les différents isomères d'acide linoléique conjugué trouvés dans les échantillons de *Bouhezza* sont mentionnés dans le tableau suivant (tableau 7).

Tableau 7: Contenu en isomères d'ALC dans le fromage *Bouhezza* (% des ALC totaux)

Isomères d'ALC	Echantillons de fromage <i>Bouhezza</i> *					
	F1E	F2SE	F3E	F4SE	F5E	F6SE
<i>t,t</i> 12 14	1.0	1.9	1.2	0.8	0.9	0.1
<i>t,t</i> 11 13	2.5	1.9	2.6	1.7	2.0	0.4
<i>t,t</i> 10 12	0.0	0.0	0.2	0.7	0.3	3.5
<i>t,t</i> 9 11	0.0	0.0	2.0	0.4	0.8	0.3
<i>t,t</i> 8 10	0.0	0.0	0.8	0.3	0.2	0.4
<i>t,t</i> 7 9	0.0	0.0	0.0	0.3	0.5	0.2
<i>c,t</i> 12 14	3.9	2.3	3.2	1.9	1.6	2.3
<i>t,c</i> 11 13	4.5	10.0	4.2	5.0	4.8	5.1
<i>t,c</i> 10 12	0.7	0.0	0.2	0.2	0.0	0.5
<i>c,t</i> 9 11	84.2	85.7	82.0	85.2	83.5	80.7
<i>t,c</i> 7 9	3.2	0.0	3.4	2.9	3.5	5.3
<i>t,c</i> 8 10	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0
$\Sigma t,t^1$	3.6	3.9	6.8	4.2	4.7	4.9

* Chaque échantillon a été analysé en double et le résultat est exprimé en moyenne

¹ Σ de *trans*12, *trans*-14 ; *trans*-11, *trans* 13 ; *trans*-10, *trans*-12 ; *trans*-9, *trans*-11 ; *trans* 8, *trans*-10 et *trans*-7, *trans*-9

S'accorder à la littérature, l'isomère *cis*-9, *trans*-11 (acide ruménique) était le plus abondant (>80%) dans les échantillons de *Bouhezza* (WERNER *et al.*, 1992). Le pourcentage de l'isomère *trans*-7, *cis*-9 est semblable ou inférieur aux valeurs trouvées dans la littérature (3-5% contre 5-10% des isomères totaux). D'un point de vue quantitatif, l'isomère *trans*-7, *cis*-9 est rapporté par d'autres auteurs comme étant le deuxième plus important des ALC après l'acide ruménique dans les produits laitiers. Cependant, dans cette étude, l'isomère *trans*-11, *cis*13 était le second isomère le plus abondant (4-10%) après l'acide ruménique. D'ailleurs GUN et SIMSEK, (2011) ont supposé que le sac de peau utilisé pour la conservation du beurre en Turquie affecte sa composition en acides gras. KRAFT *et al.* (2003) ont rapporté que le pourcentage en isomère *trans*-11, *cis*-13 peut augmenter pour les laits de pâturage de montagne riche en acide α -linoléique, le précurseur de l'isomère *trans*-11, *cis*-13.

Les concentrations en isomères d'ALC dans les échantillons de *Bouhezza* sont rapportées sur le tableau suivant (tableau 8):

Tableau 8: Contenu en isomères d'ALC dans le fromage Bouhezza ($\mu\text{g/g}$ matière grasse)

Isomères d'ALC	Echantillons de <i>Bouhezza</i> *					
	F1E	F2SE	F3E	F4SE	F5E	F6SE
<i>t,t</i> 12 14	6.8	30.6	13.4	7.5	10.1	1.0
<i>t,t</i> 11 13	16.7	30.8	27.7	15.9	22.7	3.2
<i>t,t</i> 10 12	0.0	0.0	2.1	6.3	4.0	30.0
<i>t,t</i> 9 11	0.0	0.0	21.2	3.5	9.3	2.9
<i>t,t</i> 8 10	0.0	0.0	8.9	3.1	2.1	3.7
<i>t,t</i> 7 9	0.0	0.0	0.0	3.0	5.6	2.1
<i>c,t</i> 12 14	25.9	37.2	35.1	17.6	18.0	19.6
<i>t,c</i> 11 13	29.4	158.1	45.4	47.0	55.0	44.2
<i>t,c</i> 10 12	4.3	0.0	2.1	2.3	0.0	4.3
<i>c,t</i> 9 11	553.1	1359.2	889.4	799.2	956.4	701.2
<i>t,c</i> 7 9	20.8	0.0	36.5	27.5	40.5	46.0
<i>t,c</i> 8 10	0.0	0.0	0.0	0.0	22.3	0.0
CLA total ¹	657.1	1585.1	1084.6	938.2	1146.0	869.2
Σ tt ²	23.6	61.4	73.3	39.3	53.8	42.8

* : Chaque échantillon a été analysé en double et le résultat est exprimé en moyenne. ¹: CLA total = ensemble des isomères mentionnés dans le tableau. ² Σ de *trans*12, *trans*-14; *trans*-11, *trans* 13; *trans*-10, *trans*-12; *trans*-9, *trans*-11; *trans* 8, *trans*-10 et *trans*-7, *trans*-9

La concentration en ALC totaux dans le fromage *Bouhezza* est comprise entre 0.66 à 1.6 mg/g de matière grasse fromagère. Ces valeurs étaient semblables à celles trouvées par GURSOY *et al.* (2003). Dans le fromage frais Turc « *Kashar* » (0.08-5.4 mg/g matière grasse) et le fromage blanc mariné (0.01-5.5 mg/g matière grasse). Les auteurs ci-dessus ont soutenu que les fromages à pâte molle avec ou sans un temps d'affinage court, contiennent une quantité inférieure d'ALC par rapport aux fromages à pâte dure. Nos résultats sont aussi proches de ceux trouvés par SEÇKIN *et al.* (2005) dans plusieurs fromages traditionnels en Turquie (1.50 à 3.63 mg/g matière grasse). En revanche, la teneur en ALC des échantillons dans le fromage *Bouhezza* était inférieure aux résultats trouvés par LIN *et al.* (1995), aussi ceux rapportés par PRANDINI *et al.* (2007) concernant quelques types de fromages italiens « *Fontina Valdostana* » (8.11 mg/g matière grasse), Pecorino : 7.77 mg/g MG. Le fromage « *Prato* » est la source diététique principale de la matière grasse laitière parmi les fromages consommés par la population brésilienne, selon TORRES et NUNES. (2010) la teneur en ALC dans ce fromage est environ 4 mg/g de matière grasse. Le régime alimentaire des vaches

durant les lactations est le facteur principal qui influence la composition en isomères d'ALC dans la matière grasse de ruminants (TORRES et NUNES, 2010).

Vers 1985, les ALC ont attiré beaucoup d'attention, quand leur propriétés anticarcérogéniques aussi bien antiathérosclérotique et des effets antidiabétiques chez les animaux ont été découvertes (BAUMAN *et al.*, 2000 et BANNI *et al.*, 2001). Des évaluations sur les allocations diététiques des ALC requis pour empêcher la cancérogenèse chez l'homme ont été suggérées par plusieurs auteurs (IP *et al.*, 2002 ; WATKINS et LI, 2003). Par exemple, BAUMAN *et al.* (2008) ont supposé qu'une quantité d'ALC de 700- 800 mg/jours pourrait contribuer à réduire l'incidence de cancer chez l'homme. Dans la présente étude, 100 g de fromage de *Bouhezza* dans le régime fourniraient seulement une petite quantité de l'acide ruménique (*cis*-9, *trans*-11) soit (0.8-1% de l'apport diététique recommandé), qui devrait être incrémenté par la proportion diététique d'acide vaccénique (C18 :1 *trans*-11) converti en ALC par Δ -9 désaturase humaine (BANNI *et al.*, 2001).

2-2 Contenu en vitamines liposolubles

Les concentrations en β -carotène et en α -tocophérol dans les échantillons de *Bouhezza* sont montrées dans le tableau suivant (tableau 9).

Tableau 9: Contenu en α -tocophérol et en β -carotène dans le fromage *Bouhezza*

	Echantillons de Bouhezza*					
	F1E	F2SE	F3E	F4SE	F5E	F6SE
α -tocophérol (mg/100g MG ¹)	4.9	2.7	2.1	2.8	5.1	1.6
α -tocophérol (mg/100g Fromage)	0.4	0.1	0.2	0.3	0.5	0.2
β -carotène (mg/100g MG)	1.9	1.1	1.6	0.9	2.0	0.3
β -carotène (mg/100g Fromage)	0.17	0.06	0.14	0.10	0.20	0.03

* : Chaque échantillon a été analysé en double et le résultat est exprimé en moyenne. 1 : Matière grasse de fromage.

Si on considère la variation du taux de matière grasse dans les échantillons de fromage, le niveau en β -carotène et en α -tocophérol est aussi référée à la matière grasse dans l'ordre de comparer le contenu en vitamines liposolubles de *Bouhezza* avec d'autres types de fromage. En moyenne, la concentration en β -carotène et en α -tocophérol référée à 100g de matière grasse fromagère a été de 1.31 ± 0.65 et 3.20 ± 1.46 mg respectivement.

Le contenu en β -carotène est particulièrement plus élevé dans les échantillons épicés F1E, F3E, F5E (Figure 11). Le piment rouge est un végétal aromatique, couramment utilisé comme une épice, mais aussi il a un effet bénéfique pour la santé (HERVERT-HERNANDEZ *et al.*, 2010). OZGUR *et al.* (2011) rapportent que le piment rouge a un contenu en β -carotène très élevé (2282.45 ± 5.362 mg/masse sèche).

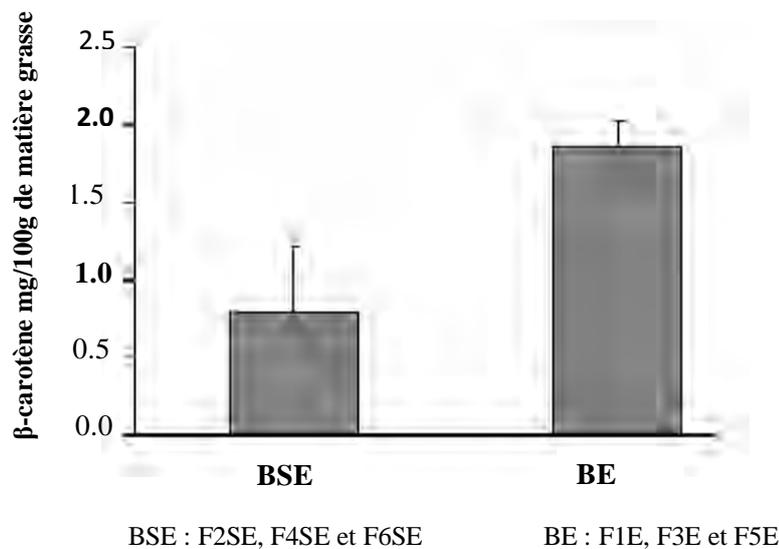


Figure 11: Moyenne du contenu en β -carotène dans les échantillons de *Bouhezza* épicé (BE) et sans épice (BSE). Chaque barre et barre d'erreur dans le graphique représente la moyenne \pm l'écart type des trois échantillons de fromage.

En général, dans le fromage *Bouhezza*, les concentrations en vitamines liposolubles sont dans l'intervalle des celles du β -carotène (0.01 à 0.8mg/100 matière grasse) et celles de l' α -tocophérol (0.1 à 5.0mg/100 matière grasse) trouvées dans d'autres types de fromage (LUCAS *et al.*, 2006 ; Département d'Agriculture des Etats Unies (USDA), 2012) . La qualité du lait cru, influencée par la race, le stade de lactation et le régime alimentaire des vaches ou bien le procédé de fabrication peuvent expliquer la variation de la concentration en vitamines liposolubles dans les échantillons de fromage *Bouhezza* (NOZIERE *et al.*, 2006) .

LUCAS *et al.* (2006) ont montré que la variation du contenu en β -carotène dans le fromage dépend exclusivement de la richesse du lait en matière grasse ($R= 0.96$), indépendamment de la technologie de fabrication de fromage. En revanche, le même auteur a

rapporté que 67% de la vitamine E (contre seulement 5% de la β -carotène) contenues dans la matière grasse du lait était en moyenne perdue pendant le procédé de fabrication de fromage. La dégradation oxydative par la lumière, la température et le contenu élevé du fromage en acides gras polyinsaturés peuvent expliquer cette perte en vitamine E.

D'un point de vue nutritionnel, 100g de *Bouhezza* apporte en moyenne 0.12 ± 0.07 mg de la β -carotène et 0.29 ± 0.2 mg de l' α -tocophérol. Selon les rations diététiques de référence de l'office de l'alimentation et de nutrition (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine., 2000), 100g de *Bouhezza* couvrent en moyenne 0.5 à 3.3% des apports diététiques recommandés (ADR) pour un homme adulte en β -carotène et en moyenne, et 1.5 à 5% des apports diététiques recommandés en vitamines E. *Bouhezza* a été comparé avec d'autres types de fromage concernant le contenu en vitamines liposolubles, la concentration en β -carotène et en α -tocophérol était plus élevée dans le fromage *Bouhezza* par rapport à d'autres fromages à faibles teneur en matière grasse. Pour 100g de produit, le contenu en β -carotène du fromage *Bouhezza* (0.06mg) est deux fois, six fois plus supérieur par rapport aux fromages italiens Ricotta (13% de matière grasse) et le fromage écrémé de maison (4,3% de matière grasse) respectivement. Aussi le contenu en α -tocophérol du *Bouhezza* (0.03mg) est deux fois plus supérieur par rapport aux fromages cités précédemment (USDA, 2012).

Cependant, la concentration en β -carotène et en α -tocophérol dans le fromage *Bouhezza* est très proche du celui de fromage *Quark* (19% de matière grasse), et le fromage fondu (34% matière grasse) (USDA, 2012 ; GAMBELLI *et al.*, 1999). D'autre part, *Bouhezza* a des niveaux en β -carotène (à l'exception des échantillons épicés) et en α -tocophérol inférieurs par rapport aux fromages affinés italiens (en moyenne 30% de matière grasse) comme Castelmagno, Parmigiano Reggiano et le Ragusano (MANZI *et al.*, 2007). Sans compter la teneur en matière grasse, aussi la teneur en eau du fromage explique la variation du contenu en vitamines liposolubles des fromages.

Conclusion

Conclusion

Dans l'optique de contribuer à la caractérisation globale du fromage *Bouhezza*, cette étude apporte de nouvelles connaissances sur sa fraction lipidique et abouti aux conclusions suivantes.

A travers les résultats obtenus par la mesure des différents paramètres physicochimiques, et selon la classification du codex alimentarius FAO/OMS. (2007), le *Bouhezza* fabriqué à base de lait de vache, 30 jours d'affinage dans la *Chekoua* peut être défini comme étant un fromage à pâte molle migras, avec un extrait sec total dégraissé (E.S.T.D) de 67% et un taux de matière grasse/extrait sec total (MG/EST) d'environ 30%. Ces valeurs sont en général compatibles avec ceux déjà mentionnés.

Les échantillons ont différencié en termes de la composition chimique, acides gras polyinsaturés et contenu en vitamines liposolubles. Cette différence semble être justifiée, car les échantillons ont été collectés de fermes différentes et de ce fait fabriqués avec de différents laits.

De point de vue nutritionnel, *Bouhezza* peut apporter une portion d'acides gras de bonne qualité, car il renferme une quantité non négligeable en acides linoléiques conjugués. En plus, le ratio de l'acide linoléique (oméga 6)/l'acide α -linoléique (oméga 3) semble être équilibré.

En outre, les échantillons de *Bouhezza* épicé par la poudre du piment rouge ont montré un contenu en β -carotène plus élevé par rapport aux autres. Le piment rouge augmente la concentration de ce pigment possédant propriétés antioxydantes intéressantes.

En moyenne, 100 g du *Bouhezza* dans un régime contribue dans les apports diététiques recommandés par 1.46% à 12% en acide linoléique, par 3% en acide linoléique et par 0.8-1% en acides linoléiques conjugués (ALC), par 0.5% à 3.3% en β -carotène et par 1.5% à 5% en vitamine E. De point de vue quantitatif, ces contributions aux apports diététiques recommandés sont relativement faibles, mais de point de vue qualitatif, elles sont très prometteuses en matière des allégations nutritionnelles qui peuvent encourager les gens à consommer ce fromage, donc pérenniser sa production pour qu'il reste toujours sauvegardé parmi le patrimoine culturel du pays.

Cette étude ne représente qu'un aperçu sur la fraction lipidique du fromage *Bouhezza*. Plusieurs études scientifiques seraient nécessaires pour analyser l'impacte de différents

facteurs de fabrication sur la qualité du fromage. Il serait donc important d'avoir plus d'informations sur le régime alimentaire du bétail qui sont à l'origine des laits utilisés pour la fabrication du fromage. Il serait également important de savoir si le procédé de fabrication du *Bouhezza* et spécialement sa maturation dans la *Chekoua* peut influencer la composition chimique et les propriétés nutritionnelles de sa fraction lipidique. Enfin, nous espérons que l'état pris en considération la législation des fromages au lait cru, donc la mise en place d'une démarche Appellation d'Origine Protégée (AOP).

Références

bibliographiques

ABU-GHAZALEH A.A., SCHINGOETHE D.J., HIPPEN R.J. et WHITLOCK L.A. 2002a. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acids (CLA) content of milk. *J. Dairy Sci.*, 85: 624-631.

ADLOF R.O., 2003. Separation of conjugated linoleic acid methyl esters by silver-ion high performance liquid chromatography in semi-preparative mode. *Journal of Chromatography A.*, 1033 : 369-371.

AISSAOUI ZITOUN O., PEDILIGGIERI C., BENATALLAH L., LORTAL S., LICITRA G., ZIDOUNE M.N., et CARPINO S. 2012. Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol. 10 (2)*: 289-295.

ALIAS C. et LINDEN G. 1997. Abrège de biochimie alimentaires. 4ème édition. *Sepaic, Paris*, 248p.

ALVES R.C., CASAL S. et OLIVEIRA, M.B.P.P. 2009. Determination of vitamin E in coffee beans by HPLC using a micro-extraction method. *Food Sci. Technol. Int.*, 15: 57-63.

ANONYME 1 : Les effets anticancérigènes de l'acide linoléique conjugué (ALC) : Centre d'information sur le bœuf, 2004. Canada.

ANONYME 2: http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/glossary/df_gel.htm., consulté le 12. 01.2012.

ANONYME 3: SKOOG D.A., WEST D.M., HOLLER F.J. *Saunders Collège Publication*).

APHA. 2004. Standard methods for the examination of dairy products. (a) Moisture/solids, Forced Draft Oven, Milk (Class A1), Other products (Class B), pp.449-451. (b) Chloride (Salt) Volhard Method (Class 0), pp.387-389. (c) Acidity, Titratable-Phenolphthalein indicator (Class 0), pp.364-366.

AYDIN R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29:189-195.

AZAIN M.J. 2003. Conjugated linoleic acid and its effects on animal products and health in singlestomached animals. *Proc Nutr Soc.*, 62 (2): 319-328.

BANNI S., CARTA G., ANGIONI E., MURRU E., SCANU P., MELIS M.P., BAUMAN D.E., FISCHER S.M., et IP C. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *Journal of Lipid Research Volume 42* : 1056-1061.

BANNI S., CARTA G., CONTINI M.S., ANGIONI E., DEIANA M., DESSI M.A., MELIS M.P et CORONGIU F.P., 1996. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *Journal of Nutrition & Biochemistry.*, 7: 150-155.

- BARBANO D.M., CLARK J.L., DUNHAM C.E., FLEMING R. 1990. Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: collaborative study. *J. Assoc. of Off. Anal. Chem Vol 73* : 849-859.
- BARRETT E.M., KELLY A.L., MCSWEENEY P.L.H. and FOX P.E. 1999. Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 9: 421-427.
- BAUMAN D.E., BARBANO D.M., DWYER D.A. et GRIINARI J.M. 2000. Technical note: Production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *J. Dairy Sci.*, 83:2422-2425.
- BAUMAN D.E., CORL B.A., BAUMGARD L. et GRIINARI J.M. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In recent Advances in Animal Nutrition. *Leicestershire: Nottingham Uni. Press.*, pp:221-250.
- BAUMAN D.E., LOCK A.L., CORL B.A, IP C., SALTER A.M. et PARODI P.W. 2008. Milk fatty acids and human health: Potential role of conjugated linoleic acid and trans fatty acids. In SEJRSEN K., HVELPLUND T. et NIELSEN M.O. (eds). *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands*, pp: 529-561.
- BEDIARE N. et BEN HANAYA H. 2006. Caractérisation physicochimique et microbiologique du fromage traditionnel algérien « Bouhezza » de ferme et de commerce. Mémoire d'ingénieur. *Université Mentouri Constantine*, 57p.
- BELURY M.A., 2002. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanism of action. *J. Nutr.*, 132: 2995–2998.
- BELURY M.A., NICKEL, K.P., BIRD C.E. et WU Y. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr. Cancer.*, 26 : 149-157.
- BENITO P., NELSON G.J., KELLEY D.S., BARTOLINI G., SCHMIDT P.C., SIMON V. 2001b. The effect of conjugated linoleic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans. *Lipids.*, 36: 221-227.
- BENITO P., NELSON G.J., KELLEY D.S., BARTOLINI G., SCHMIDT P.C., SIMON V. 2001a. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids.*, 36: 229-236.
- BENMASSAI W. et FATHALLAH Z., 2009. Suivi des caractéristiques physico-chimiques et sensorielles de Bouhezza au lait de vache et de mélange (vache et chèvre). Mémoire d'ingénieur. *Université Mentouri Constantine*, 86p.
- BERDEAUX O., GNAEDIG S., CHARDIGNY J.M., ET AL 2002. In vitro desaturation and elongation of rumenic acid by rat liver microsomes. *Lipids.*, 37 (11) : 1039-1045.

- BLANKSON H., STAKKESTAD, J.A., FAGERTUN H., THOM E., WADSTEIN J., GUDMUNDSEN O. 2000. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr.*, 130: 2943-2948.
- BOUGNOUX P., LAVILLONNIERE F., RIBOLI E., CHAJES V., MARTIN J. et LHUILLERY C. 1999. Inverse relation between CLA in adipose breast tissue and risk of breast cancer: A case-control study in France, Health and Nutrition Section-3, S43 *In Am. Oil Chemist's Soc. Annual meeting, France.*
- BRULE G., LENOIR J., et REMEUF., 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait In *Le fromage*. Ed., Eck A., 3^{ème} édition *Tec et DOC Lavoisier, Paris*, pp. 7-41.
- BURTON G.W. et INGOLD K.U. 1984. β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-573.
- BYNUM D. G., BARBANO D.M., 1985. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese manufacture: chemical changes during aging. *Journal of Dairy Science.*, Vol 68: 1-10.
- CAKMAKCI S., DAGDEMIR E., HAYALOGLU A.A., GURSES M., GUNDOGDU E. 2008. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World J Microbiol Biotechnol.*, 24: 293-299.
- CAYOT P. et LERIENT O., 1998. Structure et techno-fonction des protéines du lait. *Edition Tec et Doc, Paris*, 363p.
- CHANG L.C., CHANG H.T. et SUN S.W. 2006. Cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography for separation of alpha-, gamma-, delta-tocopherol and alpha-tocopherol acetate. *Journal of Chromatography A.*, 1110: 227-234.
- CHENG J.L., FUTAKUCHI M., OGAWA J. 2003. Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawleys rats. *Cancer Letters.*, 196 : 161-168.
- CHILLIARD Y., FERLAY A., DOREAU M. 2001. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA Prod Anim.*, 14 (5): 323-335.
- CHIN S.F., LIU W., STORKSON J.M., HA Y.L. et PARIZA M.W., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food. Comp. Anal.*, 5: 185-197.
- CHOISY C., DESMAZEAUD M.J., GRIPON J.C., LAMBERT G. et LENOIR J., 1997. La biochimie de l'affinage. *In Le fromage*. 3^{ème} édition *Tec et Doc Lavoisier*, pp 86-153, 875p.
- CODEX ALIMENTARIUS STAN A-6-1978. Normes générales codex pour le fromage. pp, 1-5.

- COLLOMB M., SIEBER R. et BUTIKOFER U., 2004. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids.*, 39: 355-364.
- COOK M.E., DRAKE B., JEROME D. et PARIZA M.W. 1999. The interaction of 9c,11t/9t,11c and 10t,12c conjugated linoleic acid on the fat deposition in mice. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.*, 13: A1023.
- COOK M.E., MILLER C.C., PARK Y. et PARIZA M.W. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-growth depression. *Poultry Sci.*, 72: 1301-1305.
- CORL B.A., BAUMGARD L.H., GRIINARI J.M. 2002 Trans-7, cis-9 CLA is synthesized endogenously by a $\Delta 9$ -desaturase in dairy cows. *Lipids.*, 37 : 681-688.
- CORTES NUNES J., GUEDES TORRES A. 2010. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. *Journal of Food Composition and Analysis.*, 23 : 782-789.
- COUET C, GREGOIRE S, OBJOIS M. 2004. Teneur en acide ruménique (c9,t11 18:2 n-9 ; CLA) du tissu adipeux (TA) humain et phénotype métabolique. *Nutrition Clinique et Métabolisme.*, 18 (Suppl.1) : S28.
- Département d'agriculture des Etats Unies (USDA). 2012. National Nutrient database for standard reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page (www.nal.usda.gov/foodcomposition/individual-macronutrients-phytonutrients-vitamins-vitaminsminerals/vitamins-minerals).
- DESBORDES C., LEA MA.,1995. Effects of C18 fatty acid isomers on DNA synthesis in hepatoma and breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 15 (5B) : 2017-2021.
- DESTAILLATS F., JAPOIT C., CHOUINARD P.Y., ARUL J. et ANGERS P. 2005. Short communications: Rearrangement of rumenic acid in ruminant fats: a marker of thermal treatments. *J. Dairy Sci.*, 88: 1631-1635.
- DHIMAN T.R., ANAND G.R., SATTER L., et PARIZA M.W., 1999b. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.*, 82: 2146-2156.
- DHIMAN T.R., HELMINK E.D., MCMAHON D.J. et FIFE R.L.W., 1999a. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *J. Dairy Sci.*, 82:412-419.
- DHIMAN T.R., SATTER L., PARIZA M.W., GALLI P.P., ALBRIGHT K. et TOLSSAJ M.X., 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.*, 83:1016-1027.
- DHIMAN T.R., SEUNG-HEE N. et AMY L.U., 2005. Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid Content in Milk and Meat. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr.*, 45: 463-482.

- DONOVAN D.C., SCHINGOETHE D.J., BAER R.J., RYALI J., HIPPEN A.R. et FRANKLIN S.T., 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83:2620-2628.
- DREVON C.A. 1991. Adsorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Radical Res. Commun.* 14: 229.
- DUGAN M.E.R., AALHUS J.L., KRAMER J.K.G. 2004. Conjugated linoleic acid pork research. *Am J Clin Nutr.*, 79(suppl) : 1212S-1216S.
- DUGAN M.E.R., AALHUS J.L., LIEN K.A. et SCHAEFER A.L.K.G., 2001. Effects of feeding different levels of conjugated linoleic acid and total oil to pigs on live animal performans and carcass composition. *Can. J. of Anim. Sci.*, 68:761-767.
- DURGAM V.R., FERNANDES G. 1997. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.*, 116: 121-130.
- ECK A. et GILLIS J.C., 1997. Le fromage. 3ème édition Lavoisier. *Tec et Doc.* 891p.
- ECK A., 1987. Le fromage. *Edition Lavoisier Tec et Doc.*
- EL CHAFII A., 1987. Thaourat El Aurès (1916). Thèse approfondie en histoire moderne de l'Algérie. *Institut d'histoire. Université d'Alger.*
- ELLEN G. et ELGERSMA A., 2004. Letter to the editor: Plea for using the term n-7 fatty acids in place of C18:2 cis-9, trans-11; and C18:1 trans 11 or their trivial names Rumenic acid and Vaccenic acid rather than the generic term conjugated linoleic acids. *J. Dairy Sci.*, 87: 1131.
- FAO 2007. Lait et Produits Laitiers. Codex Alimentarius. *FAO and OMS, Rome*, 258 p.
- FOGERTY A.C., FORD G.L., SVORONOS D., 1988. Octadeca-9,11-dienoic acid in foodstuffs and in lipids of human blood and breast milk. *Nutrition Reports International.*, 38 (5): 937-943.
- FOLCH J., LEES M. et SLOANE-STANLEY G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry Vol 226:* 497-509.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *National Academy Press, Washington, DC.*
- FOX P.F. et KELLY A.L., 2006. Review: Indigenous enzymes in milk: *Overview and historical aspects-part.* *International Dairy Journal volume 16, issue 6*, pp. 500-516.
- FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M et MCSWEENY P.L.H., 2000. Fundamentals of cheese science. *Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc.*

- FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M. and MCSWEENEY P.L.H., 2000. Fundamentals of cheese science. *Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc.*
- FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, 12: 457-509.
- FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H., COGAN T.M., GUINEE T.P., 2004. Cheese, chemistry, physics and microbiology. General Aspects. *Third edition.*
- GAMBELLI L., MANZI P., PANFILI G., VIVANTI V. et PIZZOFERRATO L. 1999. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy. *Food Chem.*, 66: 353-358.
- GELAIS-St. D., TIRARD-C.P., BELONGER G., COUTURE R. et DRAPEAU R., 2002. Fromage. In Sciences et technologies du lait, transformation de lait. *Ed VIGNOLA C. Ecole polytechnique de Montréal*, pp 349-412, 599p.
- GNÄDIG S., 2002. Conjugated linoleic acid (CLA): Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism. Thèse de doctorat spécialisée. *Université de Hambourg.*
- GOROSTIZA A., CICHOSCKI A.J., VALDUGA A.T., VALDUGA E., BERNARDO A and FRESNO J.M., 2004. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Journal of Food Chemistry.*, 85: 407-414.
- GRIINAR J.M., CORL B.A., LACY S.H., CHOUINARD P.Y., NURMELA K.V.V. et BAUMAN D.E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ -9 desaturase. *J. Nutr.*, 130:2285-2291.
- GUINEE T.P et MCSWEENEY P.L.H. 2006. Significance of milk fat in cheese, pp.397-440. In FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H. Advanced Dairy Chemistry Vol. 2: *Lipids. Third Edition. Springer ScienceBusiness Media, Inc.*
- GUIRAUD J.P. 2003. Microbiologie alimentaire. *DUNOD, Paris*, 651p.
- GUN I. et SIMSEK B. 2011. The fatty acid composition of butter stored in sheep's or goat's stomach (Karinyagi). *Food and Nutrition Sci.*, 2: 402-406.
- GURSOY O., SECKIN A.K., KINIK O. et METIN M. 2003. Conjugated linoleic acid (CLA) content of most popular Turkish hard and soft cheeses. *Milchwissenschaft.*, 58: 622-623.
- HA Y.L., GRIMM N.K. et PARIZA M.W., 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heataltered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis.*, 8: 1881-1887.

- HA Y.L., STORKSON J.M., PARIZA M.W., 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, 50 : 1097-1101.
- HALLEL A. 2001. Fromages traditionnels algériens. Quel avenir? *Revue Agroligne.*, 14: 43-47.
- HARFOOT C.G.; HAZELWOOD G.P., 1988. Lipid metabolism in the rumen. In HOBSON P. (Eds.), *The rumen microbial ecosystem. Elsevier Sciences Publishers, London (Great Britain)*. 285-322.
- HARRATI E., 1974. Recherche sur l'iben et la klila Algériens. Thèse de doctorat de 3ème cycle. *Université de Caen*.
- HARTMAN A.M., DYDEN L.P. 1965. Vitamins in milk and milk products. *American Dairy Science Association, Champaign, IL, USA*.
- HAUG A ., HØSTMARK A.T. et HARSTAD O.M. 2008. *Lipids in Health and Disease. BioMed Central.*, 6: 25.
- HAUSWIRTH C. B., SCHEEDER M.R.L. et BEER J.H. 2004. High ω -3 fatty acid content in alpine cheese. The basis for an alpine paradox. *Circulation.*, 109: 103-107.
- HAYALOGLU A.A., FOX P.F., GUVEN M et CAKMAKCI S. 2007. Cheeses of Turkey: 1. Varieties ripened in goat-skin bags. *Le Lait.*, Vol 87:79-95.
- HERVERT-HERNÁNDEZ D., SÁYAGO-AYERDI S.G. et GOÑI I. 2010. Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 3399-406.
- HIDIROGLOU N., MCDOWELL L.R., BALBUENA O. 1989. Plasma Tocopherol in sheep and cattle after ingesting free or acetylated Tocopherol. *J. Dairy Sci.*, 72: 1793-1799.
- HORNE D.S., 2002. Caseins, micellar structure. In ROGINSKI H., FUQUAY J. et FOX P.F. (Eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1902-1909). *London: Academic Press*.
- HUBBARD N.E, LIM D, SUMMERS L. 2000. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Letters.*, 150 : 93-100.
- INTERNATIONAL STANDARD 2008. ISO 3433. Cheese -Determination of fat content VanGulik method. *Second edition*. pp.1-12.
- INTERNATIONAL STANDARD 2008. ISO 707. Milk and milk products –Guidance on sampling. *Third Edition*. pp. 1-48.
- IP C., CHIN S.F., SCIMECA J.A. et PARIZA M.W., 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51., 6118-6124.

IP C., DONG Y., IP M.M., BANNI S., CARTA G., ANGIONI E., MURRO E., SPADA S., MELIS M.P. et SAEBO A. 2002. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer.*, 43: 52-58.

IP C., SCIMECA J.A. et THOMPSON H., 1995. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr Cancer.*, 24 : 241-247.

IP C., SCIMECA J.A., THOMPSON H.J., 1994. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat source. *Cancer.*, 74 : 1050-1054.

IRLINGER F et MOUNIER J. 2009. Microbial interactions in cheese : Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology.*, 20: 142-148.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MADRANT., SCHUCK P et BRULE G., 2008. Les produits laits, 2ème édition *TEC et DOC Lavoisier*, 185p.

JEANTET R., CROGUENNEC., SCHUCK P. et BRULE G., 2006. Science des aliments. *Volume 2, Technologies des produits alimentaires*, 456p.

JENSEN, R.G. et NEWBURG D.S. 1995. Bovine milk lipids. In *Handbook of milk composition*. JENSEN R.G. *Academic Press, USA*, pp: 543-575.

JIANG J., BJORCK L., FONDEN R. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 95-102.

JIANG J., WOLK A., VESSBY B., 1999. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr.*, 70: 21-27.

JOTTERAND C. et KIZIRIAN N., 2007. Les acides gras oméga 3 et omega 6 : pourquoi sont-ils essentiels ?. *Haute école de santé Genève, Filière Diététique*: 1-7.

KALIT M.T., KALIT S., HAVRANEK J., 2010. An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mljekarstvo.*, Vol 60 (3) : 149-155.

KEENAN T.W., et PATTON S. 1995. The structure of milk. In *Handbook of milk composition* Edited by: *Jensen RG. Academic Press, USA*; pp: 5-50.

KELLY G.S., 2001. Conjugated linoleic acid: a review. *Alternative Medicine Review.*, 6:367-388.

KELLY M.L., BERRY J.R., DWYER A.D., GRINARI J.M., CHOUINARD P.Y., VAN AMBURGH M.E., BAUMAN D.E. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.*, 128: 881-885.

KELSEY J.A., CORL B.A., COLLIER R.J. et BAUMAN D.E. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86: 2588-2597.

- KEMP P.; WHITE, R.W., LANDER, D.J. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including new species. *J. General Microbiol.*, 90, 100-114.
- KEPLER C.R., TOVE S.B. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids : purification and properties of a linoleate Δ^{12} cis- Δ^{11} trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 242 : 5686-5692.
- KHANAL R.C. et DHIMAN T.R. 2004. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA) Review. *Pakistan J. Nutr.*, 3:72-81.
- KIM K.H., PARK H.S. 2003. DIETARY supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition.*, 19 : 772-777.
- KNECHT P. et JÄRVINEN R. 1999. Intake of dairy products and breast cancer risk. In *Adv. in Conjugated Linoleic Acid Res.*, Vol 1. Cité par PALMQUIST (2001).
- KOHNO H., SUZUKI R., NOGUCHI R. 2002. Dietary conjugated linoleic acid inhibits azomethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Jpn J Cancer Res.*, 93: 133-142.
- KOOLMAN J ; RÖHM K.H. 1997. Taschenatlas der Biochemie. *Georg-Thieme-Verlag*, 2. Aufl., Stuttgart, Germany.
- KRAFT J., COLLOMB M., MÖCKEL P., SIEBER R. et JAHREIS G. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids.*, 38: 657-664.
- KRAMER J.K.G., PARODI P.W., JENSEN R.G., MASSOBA M.M., YURAWECZ M.P. et ADLOF R.O. 1998. Rumenic acid; a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids.*, 33: 835.
- KREIDER R.B., FERREIRA M.P., GREENWOOD M., WILSON M. et ALMADA A.L. 2002. Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. *J. Strength Cond. Res.*, 16:325–334.
- KRIS-ETHERTON P M., HARRIS W.S. et APPEL L.J. 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the. *American Heart Association. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23:151-152.
- KRITCHEVSKY D., TEPPER S.A., WRIGHT S., TSO P. et CZARNECKI S.K. 2000. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19: 472S–477S.
- LAMBORDA M.A. et RUBIOLO A.C. 1999. Proteolysis of fynbo cheese salted with NaCl/KCl and ripened at two temperatures. *Journal of Food Science.*, 64 (1): 33-36.

- LAVILLONNIÈRE F., MARTIN J.C., BOUGNOUX P., SÉBÉDIO, J.L., 1998. Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 343-352.
- LEDOUX M., 2006. Les Acides Linoléiques Conjugués : présence dans les aliments & propriétés physiologiques. *CHOLE-DOC, Centre de Recherche et d'Informations Nutritionnelles.*, 94 : 1-13.
- LEE K.N., KRITCHEVSKY D., PARIZA M.W. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.*, 108: 19-25.
- LEJAOUEN J.C., 1977. La fabrication du fromage de chèvre fermier. *Institut Technique de l'Elevage ovin et caprin. ITOVIC, Paris.* pp 18-37, 214p.
- LEMOUCHI L., 2007. Le fromage traditionnel Bouhezza : Enquête dans la wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physicochimiques de deux fabrications. Mémoire d'ingénieur. *Université Mentouri Constantine*, 65p.
- LIN H., BOVLSTON T.D., CHANG M. J., LUEDECKE L.O. et SHULTZ T.D. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.*, 78: 2358-2365.
- LUCAS A., AGABRIEL C., MARTIN B., FERLAY A., VERDIER-METZ I. et COULON, J. B. 2006. Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese. *Lait.*, 86: 177-202.
- LUCAS A., HULIN S., MICHEL V., AGABRIEL C., CHAMBAJ.F., ROCK E., COULON J.B. 2006a. Relations entre les conditions de production du lait et les teneurs en composés d'intérêt nutritionnel dans le fromage : étude en conditions réelles de production. *INRA Prod. Anim.*, 19 (1) : 15-28.
- LUNA P., JUÀREZ M., DE LA FUENTE M.A., 2006. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Journal of Food Chemistry.*, Vol 103 : 1465–1472.
- MA D.W., WIERZBICKI A.A., FIELD C.J. et CLANDININ M. T. 1999. Conjugated linoleic acid in Canadian dairy and beef products. *J. Agric Food Chem.*, 47: 2358-2365.
- MANZI P., MARCONI S., DI-COSTANZO M.G. et PIZZOFERRATO L. 2007. Composizione di formaggi DOP italiani. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione.*, 36: 9-22.
- MARINO V.M., LA TERRA S., LICITRA G et CARPINO S. 2010. Effetto del trattamento termico sulle sostanze nutraceutiche del latte. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, Vol 61:19-27.
- MCSWEENEY P.L.H. 2011. Biochemistry of Cheese Ripening. pp 667-675. In FUQUAY J.W., FOX P.H., MCSWEENEY P.L.H. Encyclopedia of Dairy Science, Ed., Elsevier science. Ltd.

MICHALSKI M., GASSI J., FAMELART M., LECONTE N., CAMIER B., MICHEL E. et BRIARD V. 2003. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Le lait*. 83: 131-143.

MILLER C.C., PARK Y., PARIZA M.W. et COOK M.E., 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 198 (3) : 1107-1112.

Module de séparations e2695 de Waters. *Manuel de l'utilisateur Révision-B. Waters Corporation 2008-2010.*

MOHEDE I., ALBERS R., VAN DER WIELEN R., BRINK L., DOROVSKA-TARAN V. 2001. Immunomodulation: CLA stimulates antigen specific antibody production in humans. *1st International Conference on Conjugated Linoleic Acid (CLA), Alesund Norvège.*

MORRIS L.J. 1966. *J. Lipid Res.*, 7 : 717-732 In Silver ion chromatography and lipids. NIKOLOVA-DAMYANOVA B, 1992. *Institute de la chimie organique. Centre de la Phytochimie, Sofia 1113, Bulgarie.*

MOUGIOS V., MATSAKAS A., PETRIDOU A. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem.*, 12 : 585-594.

NEVILLE M.C. et JENSEN R.G. 1995. Hand book of milk, the physical proprieties of human and bovin milk. Ed JENSON. *Academic press*, 592p.

NIKOLOVA-DAMYANOVA B, 1992. Silver ion chromatography and lipids. *Institute de la chimie organique. Centre de la Phytochimie, Sofia 1113, Bulgarie.*

NOONE E.J., ROCHE H.M., NUGENT A.P., GIBNEY M.J. 2002. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *The British Journal of Nutrition.*, 88: 243-251.

NOZIERE P., GRAULET B., LUCAS A., MARTIN B., GROLIER P. et DOREAU M. 2006. Carotenoids in ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131: 418-450.

NOZIERE P., GRAULET B., LUCAS A., MARTIN B., GROLIER P., DOREAU M. 2006a. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131: 418-450.

NUGENT A.P., ROCHE H.M., NOONE E.J. 2005 .The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune function in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr.*, 59 : 742-750.

ONER Z., SAGÄDIÇ O. et ŞİMŞEK B. 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *Eur.Food Res. Technol.*, 219: 455-459.

- ONTSOUKA C.E., BRUCKMAIER R.M., BLUM J.W. 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *J. Dairy Sci.*, 86: 2005-11.
- OZGUR M., OZCAN T., AKPINAR-BAYIZIT A. et YILMAZ-ERSAN L. 2011. Functional compounds and antioxidant properties of dried green and red peppers. *Afr. J. Agr. Res.*, 6: 5638-5644.
- PALOZZA P. et KRINSKY N.I. 1992. β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol 297: 84-187.
- PARIZA M.W., PARK, Y. et COOK M.E., 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 223: 8-13.
- PARK Y., ALBRIGHT K.J., LIU W., STORKSON J.M., COOK, M.E. et PARIZA M.W. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids.*, 32: 853-858.
- PARK Y., STORKSON J.M., ALBRIGHT, K.J., LIU W. et PARIZA M.W. 1999b. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids.*, 34: 235-241.
- PARODI P. W. 1996. Milk fat components: possible chemopreventive agents for cancer and other diseases. *Aust. J. Dairy Technol.*, 51: 24-32.
- PARODI P.W. 2003. Anti-Cancer agents in milk fat. *Australian J. Dairy Technol.*, 58: 114-118.
- PARODI P.W., 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of Bovine milk fat. *J. Dairy Sci.*, 82: 1339-1349.
- PARODI, P. W. 1994. Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Australian Journal of Dairy Technology.*, 49: 93-97.
- PIPEROVA L.S., SAMPUGNA J., TETER B.B., KALSCHEUR K.F., YURAWECZ M.P., KU Y MOREHOUSE, K.M. et ERDMAN, R.A. 2002. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J Nutr.*, 132 : 1235-1241.
- PRANDINI A., SIGOLO S., TANSINI G., BROGNA N., PIVA G.F. 2007. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis.*, 20: 472-479.
- RAMET J.P. 1987. La préparation du caillé. In Le fromage. ECK A. 2ème édition Tec et Doc.
- REHMAN S-UR and FOX P.E. 2002. Effect of added of o-ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. *Food Chem.*, 76: 21-26.

- REVILLE W.J. et FOX P.F., 1978. Soluble protein in Cheddar cheese : A comparison of analytical methods. *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 2: 67-76
- RICKERT R., STEINHART H., 2001. Bedeutung, Analytik sowie Vorkommen von konjugierten Linolsäureisomeren (CLA) in Lebensmitteln. *Ernährungs-Umschau.*, 48: 4-7.
- RICKERT R., STEINHART H., FRITSCHKE J., SEHAT N., YURAWECZ M.P., MOSSOBA M.M., ROACH J.A.G., EULITZ K., KU Y. et KRAMER J.K.G. 1999. Enhanced resolution of conjugated linoleic acid isomers by tandem-column silver-ion high performance liquid chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, 22: 144-148.
- RITZENTHALER K.L., MCGUIRE M.K., FALEN R., SHULTZ T.D., DASGUPTA N. et MCGUIRE M.A. 2001. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr.*, 131: 1548–1554.
- ROMANO R., GIORDANO A., CHIANESE L., ADDEO F., SPAGNA-MUSSO S. 2011. Triacylglycerols, fatty acids and conjugated linoleic acids in Italian Mozzarella di Bufala Campana cheese. *Journal of Food Composition and Analysis.*, 24 : 244-249.
- SAOUDI Z., 2012. Caractérisation microbiologique et de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « Bouhezza » de ferme. Mémoire de magister, *Université Mentouri Constantine*, 75p.
- SCHIERLE J., PIETSCH B., CERESA A. et FIZET C. 2004. Method for the Determination of β -Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase Liquid Chromatography: Single Laboratory Validation. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL.*, 87 (5): 1070-1082.
- SCHONBERG S., KROKAN H.E. 1995. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res.*, 15 (4): 1241-1246.
- SEBEDIO J.L., JUANEDA P., DOBSON G., RAMILISON I., MARTIN J.C., CHARDIGNY J.M. et CHRISTIE W.W. 1997. Metabolites of conjugated linoleic acid in the rat. *Biochim Biophys Acta.*, 1345 : 5-10.
- SECKIN A.K., GURSOY O., KINIK O et AKBULUT N. 2005. Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. *L. W. T.*, 38: 909-915.
- SEHAT N., RICKERT R., MOSSOBA M.M., KRAMER J.K.G., YURAWECZ M.P., ROACH J.A.G., ADLOF, R.O., MOREHOUSE K.M., FRITSCHKE J., EULITZ K.D., STEINHART H., KU, Y. 1999. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion high-performance liquid chromatography. *Lipids.*, 34: 407-413.

SERHAN M. 2008. Valorisation des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation en fromage Dariyeh et établissement de la caractéristiques physicochimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine. Thèse de doctorat. *Institut National polytechnique de Lorraine*, 199p.

SERHAN M., LINDER M., HOSRI C et FANNIA J. 2010. Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goats milk cheese. *Small Ruminant Research.*, Vol 90:75-82.

SHANTHA N.C., DECKER E.A., HENNIG B. 1993. Comparison of methylation methods for the quantitation of conjugated linoleic acid isomers. *J. AOAC Int.*, 76: 644-649.

SHINGFIELD K.J., AHVENJÄRVI S., TOIVONEN V., ÄRÖLÄ A., NURMELA K.V.V., HUHTANEN P. AND GRINARI J.M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acid and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.*, 77: 165-179.

SIMOPOULOS A.P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.*, 56: 365–79.

SOUSA M.J. and MCSWEENEY P.L.H. 2001. Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camemberttype cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.*, 40: 83-95.

STANTON C., LAWLESS F., KJELLMER G., HARRINGTON D., DEVERY R., CONNOLLY J.F. et MURPHY J. 1997. Dietary influences on Bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.*, 62:1083-1086.

Technical Specification 2008. ISO/TS 17837:2008. Processed cheese products -Determination of nitrogen content and crude protein calculation-Kjeldahl method. pp. 1-20.

THOMPSON H., ZHU Z., BANNI S., DARCY K., LOFTUS T. et IP C. 1997. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: Implication for reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.*, 57: 5067–5072.

TOUATI K., 1990. Contribution à l'étude microbiologique et physico-chimique d'un fromage artisanal Algérien « La Klila ». Mémoire d'ingénieur, *Université Mentouri Constantine*, 83p.

TOZLOVANU M. 2008. Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Thèse de doctorat. *Institut National Polytechnique de Toulouse*, 261p.

TRICON S., BURDGE G.C., KEW S., ET AL. 2004. Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr.*, 80 (3) : 614-620.

TRUITT A., MCNEILL G., VANDERHOEK J.Y. 1999. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1438: 239-246.

- VEISSEYRE R. 1979. *Technologie du lait. 3ème édition Maison Rustique*, 714p.
- VIGNOLA C. 2002. Sciences et technologies du lait, transformation de lait. *Ecole polytechnique de Montréal*, 599p.
- VISONNEAU S., CESANO A., TEPPER S.A., SCIMECA J.A., SANTOLI D. Et KRITCHEVSKY D., 1997. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res.*, 17: 969-973.
- WALTHER B., SCHMID A., SIEBER R., WEHRMULLER K. 2008. Cheese in nutrition and health, Review. *Dairy Sci. Technol.*, 88: 389-405.
- WATKINS B.A. et LI Y. 2003. CLA in functional food: Enrichment of animal products. In SEBADIO J.L., CHRISTIE W.W. et ADOLF R. (eds). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. AOCS Press, Champaign IL*, pp: 174-188.
- WEISS M.F., MARITZ F.A., PAS. et LORENZEN C.L. 2004b. Review: conjugated linoleic acid: implicated mechanisms related to cancer, atherosclerosis, and obesity. *The Professional Anim. Sci.*, 20: 127-135.
- WERNER S. A., LUEDECKE L.O. et SHULTZ T. D. 1992. Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: effects of cheese cultures, processing, and aging. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1817-1821.
- WEST D.B., DELANY J.P., CARMET P.M., BLOHM F., TRUETT A.A. et SCIMECA J. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.*, 275: 667-672.
- ZAIDI O., ZERTAL M. et ZIDOUNE M.N. 2000. Présentation d'un fromage traditionnel bouhezza. *Journal Algérien de Médecine.*, 2: 96-101.
- ZARMPOUTIS I.V., MCSWEENEY P.L.H. et FOX P.E. 1997. Proteolysis in blue-veined cheese: an intervarietal study. *Irish. J. Food Res.*, 36: 219-229.
- ZU H.X., SCHUT H.A. 1992. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adduct formation in CDF1mice by heat-altered derivatives of linoleic acid. *Food Chem Toxicol.*, 30 (1): 9-16.



A survey of fat-soluble antioxidants, linolenic acid and conjugated linoleic acid content of traditional Algerian Bouhezza cheese

Vita Maria Marino^{1*}, Abdassalem Belbeldi², Stefania La Terra¹, Mario Manenti¹, Giuseppe Licitra^{1,3} and Stefania Carpino¹

¹Consorzio di Ricerca della Filiera Lattiero Casearia, Ragusa, Italy, ²Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires, Université Mentouri de Constantine, Route Ain El Bey, Constantine, Algérie. ³Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, University of Catania, Italy. e-mail: v.marino@corfilac.it, abdassalem.inataa@yahoo.fr, laterra@corfilac.it, manenti@corfilac.it, licitrag@corfilac.it, carpino@corfilac.it

Received 30 June 2012, accepted 29 September 2012.

Abstract

Bouhezza is a traditional Algerian low-fat soft cheese. It can be produced from goat, sheep, cow milk or from mixed milks. The traditional cheesemaking of Bouhezza cheese requires the preparation of a natural container - "chekoua" - from goat or sheep skin, with the role of serum separator and solid phase. In these skin-bags, the "lben" is obtained by churning and partially skimming of spontaneously fermented milk. The end of the manufacturing is characterized by the addition of whole raw milk, that allows to correct the cheese salinity and acidity. The aim of this study was to characterize the composition of healthy beneficial molecules in Bouhezza cheese. A total of six individual cheeses, manufactured from cow milk in six rural farms located in the Aurès Mountains of south of Constantine in Algeria, was collected. Bouhezza cheese samples were kept into the "chekoua" bags for a period of 30 days and only three of these samples were spiced with red pepper at the end of manufacturing. The cheese samples were analysed for fat-soluble vitamins, linolenic acid and conjugated linoleic acid content. Beta-carotene and alpha-tocopherol levels referred to 100 g of cheese ranged 0.03 - 0.2 mg and 0.1 - 0.5 mg, respectively. Beta-carotene content was significantly higher in cheese samples spiced with red pepper. Linolenic acid and conjugated linoleic acid levels referred to 100 g of cheese ranged 30 - 58 mg and 6.0 - 11.5 mg, respectively. Raw milk quality and production technology might explain the variations of healthy beneficial molecules content in Bouhezza cheese samples.

Key words: Bouhezza cheese, beta-carotene, alpha-tocopherol, linolenic acid, conjugated linoleic acid, health.

Introduction

Bouhezza is a traditional Algerian cheese¹. This typology of cheese is produced only in restricted geographical areas of the country. It is manufactured on a very small scale and depends on the availability of milk, in fact, it can be produced from goat, ewe or cow milk and their mixtures. The technology of production of Bouhezza cheese is similar to the one used in Croatia, Bosnia and Herzegovina, Montenegro and Turkey for some types of cheeses termed as "cheese in a sack"². Bouhezza cheese making requires the preparation of a natural container, "chekoua", where a spontaneous fermentation of milk, "lben", occurs. The "chekoua" is prepared from goat or sheep skin and treated mainly with salt and juniper berry. In addition, it plays an important role as serum separator and solid phase (ultra filter). Lben is obtained by churning and partially skimming of spontaneously fermented milk after production of butter. The cheese is usually ripened into the skin-bags for one or two months. The final process of the cheese making is characterized by the addition of whole raw milk, that allows to correct the cheese salinity and acidity. Before consumption, the cheese is generally spiced with red hot pepper. Bouhezza cheese can be consumed as a spread cheese on traditional bread "Kasra" or in salads or to make cheese sauces. When it is dried, it can be an ingredient to make traditional dishes such as "Aicha" Couscous.

The presence in milk and dairy products of relevant biologically

active molecules that provide physiological benefits or protection against chronic diseases are well documented³. Fat-soluble vitamins as β (beta)-carotene, α (alpha)-tocopherol and polyunsaturated fatty acids, including linolenic acid (LNA) and conjugated linoleic acid (CLA) molecules, belong to this category of beneficial molecules. Both β -carotene and α -tocopherol have received considerable interest by researchers, due to their antioxidant properties by stopping the production of reactive oxygen species⁴. These fat-soluble antioxidants neutralize free radicals in the human body and, thus, in addition to delaying the aging process⁵, they reduce the risk of diseases such as arthritis, cardiovascular disease⁶ and cancer⁷. Linolenic acid may also protect from cardiovascular diseases⁸. Moreover, CLA has been attributed a variety of healthy biological effects, primarily associated to *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 CLA⁹. Although CLA is best known for its anticancer properties, researchers have also found that the *cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA can reduce the risk for cardiovascular disease and help fight inflammation¹⁰.

Given that information about Bouhezza cheese composition is rather limited in literature, the aim of this study was to determine the Bouhezza cheese content of some healthy beneficial compounds including β -carotene, α -tocopherol, LNA and CLA molecules.

Materials and Methods

Samples: A total of six farms, based on real herd management systems producing traditional Bouhezza cheese, were randomly selected in order to have a larger range of conditions for this study. These rural farms belonged to the Chaouias' group, that lives in the Aurès Mountains of south of Constantine in Algeria. Six individual Bouhezza cheeses samples (B1, B2, B3, B4, B5, B6) were collected. All cheese samples were produced with cow milk and following traditional cheese making procedures. The manufacturing process of the cheeses was carried out by "lben" fermented milk and, at the end, by addition of raw milk. The cheesemaking was completed only 30 days later. Red pepper spice was added to three cheese samples - B2, B3, B4 - at the end of manufacturing. Individual cheese samples were collected and carried in containers under refrigerated conditions from Algeria to Italy. In the laboratory, they were immediately sampled according to the ISO sampling procedures¹¹, stored at -20°C and analysed within one week of collection.

All analyses of individual cheese samples were done in duplicate and the results were expressed as means and standard deviations.

Chemical analyses: Cheese samples were analysed for total solids^{12a}, salt^{12b} and titratable acidity^{12c}, fat¹³, total nitrogen¹⁴ with conversion to protein content by using a factor of 6.38, while pH was determined by potentiometric method.

Determination of β -carotene and α -tocopherol: Both β -carotene and α -tocopherol extractions were performed on thawed cheese samples. Each stage of the analysis was carried out in darkness to avoid oxidation reactions. The extraction of β -carotene and α -tocopherol was performed on 0.5 g of cheese according to Palozza and Krinsky¹⁵ and Marino *et al.*¹⁶, respectively. The analytical method for the quantification of vitamins has been optimized by using a 60% w/v KOH solution for *all-trans*- β -carotene analysis and a 10% w/v KOH solution for α -tocopherol analysis, respectively. The recovery of both vitamins was above 85% and the repeatability was within the accepted range with a variation coefficient below 10%. Each cheese sample was mixed with 1 mL of KOH and 2 mL of ethanol (99.5% v/v) containing BHT (0.5% w/v) and incubated in a water bath at 70°C for 30 min after being purged with nitrogen and capped. During the incubation, the tubes were briefly vortex-mixed every 10 min. The samples were extracted twice with hexane and centrifuged at 1500 x g for 10 min at 10°C. The upper organic layer was carefully transferred to a clean Pyrex tube and evaporated under a gentle stream of nitrogen and the residue reconstituted in methanol. Vitamin concentrations were carried out with high pressure liquid chromatography (HPLC) method by using a SB-C18 column (5 μ m particle size, 4.6 nm ID x 250 nm, Agilent Zorbax) with a flow rate of 1.2 mL/min. The HPLC system (Waters 2695) was equipped with a dual λ Absorbance detector (Waters 2487) set at a wavelength of 450 nm for *all-trans*- β -carotene detection, and with a multi λ fluorescence detector (Waters 2475) using an excitation wavelength of 297 nm and an emission wavelength of 340 nm for α -tocopherol detection. Beta-carotene and α -tocopherol standards were used as external standards.

Determination of linolenic acid and conjugated linoleic acid: Total lipids were extracted from cheese by the method of Folch *et*

*al.*¹⁷. Aliquots were saponified as described by Banni *et al.*¹⁸ in order to obtain free fatty acids (FFA) for HPLC analysis. Moreover, particular attention was paid at each stage of the analysis to avoid heating or excessive exposure to air and light in order to prevent oxidation of the samples. Separation of PUFAs (polyunsaturated fatty acids) and MUFAs (monounsaturated fatty acids) was carried out with a HPLC system by using a SB-C18 column (5 μ m particle size, 4.6 nm ID x 250 nm, Agilent Zorbax). Polyunsaturated fatty acids were detected at 200 nm by using a dual λ absorbance detector (Waters 2487). Separation of CLA isomers as FFA was carried out with the same HPLC system using two silver-ion in series ChromoSpher 5 lipid Chrompack columns (5-mm particle size, 34.6 ID x 250 mm, Chrompack International BV, Middelburg, The Netherlands). Conjugated linoleic acid isomers were detected at 234 nm by using a dual λ absorbance detector (Waters 2487).

Results and Discussion

Bouhezza chemical composition: The chemical composition of Bouhezza cheese is shown in Table 1. Differences in chemical composition among cheese samples were found. Bouhezza cheese had the moisture content between 73-77%, the pH ranged between 3.7-4.2 and the fat content between 6-11%. The salt content was in the range of 1.8 and 2.3%. Following the classification of cheese issued by Codex Alimentarius (FAO/WHO, Standard A6), Bouhezza cheese from cow milk at 30 days of manufacturing can be defined as a low-fat soft cheese for the fat content of about 10% on dry basis (FDB) and the moisture content of about 67% on fat-free basis (MFFB).

Fat-soluble vitamins: Both β -carotene and α -tocopherol concentrations in cheese samples are reported in Table 1. Considering the large variability of fat levels in cheeses, the β -carotene and α -tocopherol levels were also referred on fat in order to compare the vitamin content of Bouhezza cheese and other cheese typologies. On average, β -carotene and α -tocopherol concentrations referred on 100 g of Bouhezza cheese fat were 1.31 \pm 0.65 mg and 3.20 \pm 1.46 mg, respectively. In particular, the content of β -carotene tended to be higher in B2, B3, B4 cheese samples spiced with red pepper (Fig. 1). Red pepper is an aromatic vegetable that has always been used as a food flavouring, but it also has a multitude of health benefits¹⁹. Ozgur *et al.*²⁰ reported that red pepper is the vegetable with the highest carotene content (2282.45 \pm 5.362 mg kg⁻¹ of dry matter).

In general, in Bouhezza cheese the fat-soluble vitamins concentration were within the range of values of β -carotene (from 0.01 to 0.8 mg/ 100 g of fat) and of α -tocopherol (from 0.1 to 5.0 mg/ 100 g of fat) found in other cheese typologies²¹⁻²³. The quality of raw milk used for cheese manufacturing, as influenced by breed, stage of lactation, diet of the cows or cheese-making technology, might explain the variations in the fat-soluble vitamin content among Bouhezza cheese samples²⁴. Lucas *et al.*²¹ showed that β -carotene variability of cheese fat depended almost exclusively on its content in milk fat ($R^2= 0.96$), independently of the type of cheese-making technologies. In contrast, the same author reported that 67% of vitamin E (against only 5% of β -carotene) present in milk fat was on average lost during the cheese-making process. Several factors could explain this vitamin E loss including oxidative degradation by light, temperature, or high polyunsaturated fatty acids content in cheese.

Table 1. Chemical composition, fat-soluble vitamins and polyunsaturated fatty acids content in Bouhezza cheese samples.

Item	Cheese samples					
	B1	B2*	B3*	B4*	B5	B6
Chemical components	(g/100 g cheese)					
Fat	5.5	9.0	8.8	9.8	10.5	9.5
Protein	13.6	10.7	13.8	11.4	11.3	12.7
Salt	1.8	2.1	2.3	1.7	2.3	2.3
TS ¹	22.9	25.7	26.9	26.7	26.9	27.4
pH	4.2	3.8	4.1	3.7	3.9	3.8
Titrateable acidity (% lactic acid)	5.5	5.4	5.3	5.6	4.3	5.5
Fat-soluble vitamins						
beta-carotene	(mg/100 g fat)					
	1.1	1.9	1.6	2.0	0.9	0.3
	(mg/100 g cheese)					
	0.06	0.17	0.14	0.20	0.10	0.03
alpha-tocopherol	(mg/100 g fat)					
	2.7	4.9	2.1	5.1	2.8	1.6
	(mg/100 g cheese)					
	0.1	0.4	0.2	0.5	0.3	0.2
PUFA ²						
LNA ³	(g/100 g fat)					
	1.3	1.4	2.0	2.8	1.7	1.7
	(mg/100 g cheese)					
	69.9	123.1	176.0	276.8	177.8	161.1
Total CLA ⁴	(g/100 g fat)					
	0.15	0.07	0.11	0.11	0.09	0.09
	(mg/100 g cheese)					
	8.3	5.9	9.5	11.2	9.9	8.3

Each cheese sample was analysed in duplicate and the results are averaged. * The samples B2, B3, B4 are with red pepper. ¹ Total solids; ² PUFA = Polyunsaturated Fatty Acids; ³ LNA = α -Linolenic Acid; ⁴ CLA = Conjugated Linoleic Acid.

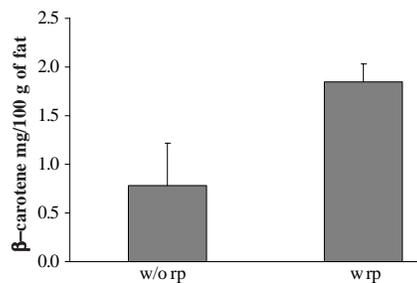


Figure 1. Content of *all-trans* β -carotene in cheese samples without (w/o rp) and with red pepper (w rp). Each bar and error bar in graphic represents the mean \pm standard deviation of three cheese samples.

From a nutritional point of view, 100 g of Bouhezza cheese supply on average 0.12 ± 0.07 mg of β -carotene and 0.29 ± 0.2 mg of α -tocopherol, respectively. Following the Dietary Reference Intakes of Food and Nutrition Board ²⁵, 100 g of Bouhezza cheese on average cover from 0.5% to 3.3% of the recommended dietary allowance (RDA) of an adult man of β -carotene and, on average, from 1.5% to 5% RDA of vitamin E. Bouhezza cheese was compared with some cheeses typologies for fat-soluble vitamin content ^{22,23,26}. The levels of both β -carotene and α -tocopherol were higher in Bouhezza cheese than in other dairy products with a low fat content. As an example, referred on 100 g of product, Ricotta cheese (13% of fat) and creamed cottage cheese (4.3% of fat) compared to Bouhezza cheese (10% of fat) contained, on average, 0.03 and 0.01 mg versus 0.06 mg of β -carotene, respectively, and

0.1 and 0.08 mg versus 0.3 mg of α -tocopherol, respectively ²³. However, Bouhezza cheese contained similar levels of β -carotene and α -tocopherol compared to Quark cheese (19% of fat) and Cream cheese (34% of fat) ^{23,26}. On the other hand, Bouhezza cheese had lower levels of β -carotene (excluding spiced samples) and of α -tocopherol than ripened Italian cheeses (on average 30% of fat) such as Castelmagno, Parmigiano Reggiano and Ragusano cheeses ²². Besides the fat level, also the content of water in pars explain the variability of fat-soluble vitamin content in cheeses.

Polyunsaturated fatty acids: In this study, attention was focused on some fatty acids of special healthy interest, including LNA and CLA. The LNA content of the six Bouhezza cheese samples is summarized in Table 1. LNA concentrations differed among the cheeses samples analysed. The range of LNA referred to gram of cheese fat was between 3.1 and 8.4 mg, which was similar to some Turkish cheeses ²⁷. The differences in LNA composition may be attributed to raw milk quality and cheesemaking technologies. In fact, Hayaloglu *et al.* ²⁸ reported that Turkish Tulum cheese composition was affected by the goat skin-bag where the cheese was ripened. Moreover, Gun and Simsek ²⁹ reported that goat and sheep stomach, used as a natural container for Karinyagi butter, affected butter fatty acid composition. Thus, it could be hypothesized that the goat or ewe skin-bag “*chekoua*” may affect the fatty acid composition of Bouhezza cheese.

Importantly, Bouhezza cheese produced with skim milk contained, on average, only 10% of linolenic acid concentration

of alpine whole milk cheeses³⁰. Linolenic acid is of special nutritional interest because it appears to be protective in the primary and secondary prevention of fatal cardiovascular events³¹. According to the 2003 guidelines of the American Heart association, a minimum intake of 1.5 g/day of LNA seems to have cardioprotective effects³². In the present study, 100 g of Bouhezza cheese within the diet would contribute on average to 3% of an adult man's RDA of LNA.

In Table 2, CLA isomer composition (% of total CLA) in cheese samples is shown. According to the literature, *cis*-9, *trans*-11 isomer of total CLA or ruminic acid was the most abundant isomer (> 80%) in Bouhezza cheese samples³³. The percentage of *trans*-7, *cis*-9 isomer was alike or lower than values in literature (3-5% vs. 5-10% of total CLA). From a quantitative point of view, the latter isomer is reported by other authors as the second most important CLA isomer after ruminic acid in dairy products. However, in the present study, the *trans*-11, *cis*-13 isomer was the second most abundant CLA isomer (4-10 %) after *cis*-9, *trans*-11. Gun and Simsek²⁹ supposed that skin bags used for butter storage in Turkey affected the fatty acid composition. Moreover, Kraft *et al.*³⁴ reported that the percentage of *trans*-11, *cis*-13 isomer of total CLA may increase as a result of grazing mountain pasture rich in α -linolenic acid, the precursor of *trans*-11, *cis*-13.

In Table 3, the concentrations of CLA isomers in cheese samples are reported. Total CLA in Bouhezza cheese fat ranged between 0.66 to 1.6 mg/g of fat. These values were similar to those found by Gursoy *et al.*³⁵ in Turkish fresh Kasha cheese (0.08-5.4 mg/g of fat) and White Pickled cheese (0.01-5.5 mg/g of fat). The above said authors sustained that soft cheese with or without short ageing time contained a lower amount of CLA than hard cheese. In contrast, the CLA content of Bouhezza cheese samples were lower than findings found by Lin *et al.*³⁶ in spread processed cheeses.

Much attention has been drawn on CLA since 1985, when its anticarcinogenic properties as well as its antiatherosclerotic and antidiabetic effects in animal models were discovered^{37,38}. Evaluations on the dietary allowance of CLA needed to inhibit carcinogenesis in humans have been suggested by several authors^{39,40}. For example, Bauman *et al.*⁴¹ assumed that a CLA amount of 700-800 mg/day might contribute to reduce cancer incidence in humans. In the present study, 100 g of Bouhezza cheese within the diet would supply only a small quantity of *cis* 9, *trans* 11 of total CLA (0.8-1% RDA), which should be incremented by the proportion of dietary vaccenic acid converted into CLA by human Δ -9 desaturase enzyme³⁸.

Conclusions

Following the chemical standards issued by Codex Alimentarius (WHO/FAO), Bouhezza cheese at 30 days of manufacturing can be defined as a low-fat soft cheese. In the current study the cheese samples differed in terms of chemical composition, of PUFA and fat-soluble vitamins content. This may be explained by raw milk quality and production technology. In addition, given that Bouhezza cheese samples with red pepper tended to be higher content of β -carotene, red pepper increases the concentration of this pigment with antioxidant properties.

On average, a portion of 100 g of Bouhezza cheese within the diet would supply a small quantity of β -carotene (0.5% to 3.3%

Table 2. CLA isomers composition in Bouhezza cheese (% of total CLA).

CLA isomers	cheese samples					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
<i>t,t</i> 12-14	1.9	1.0	1.2	0.9	0.8	0.1
<i>t,t</i> 11-13	1.9	2.5	2.6	2.0	1.7	0.4
<i>t,t</i> 10-12	0.0	0.0	0.2	0.3	0.7	3.5
<i>t,t</i> 9-11	0.0	0.0	2.0	0.8	0.4	0.3
<i>t,t</i> 8-10	0.0	0.0	0.8	0.2	0.3	0.4
<i>t,t</i> 7-9	0.0	0.0	0.0	0.5	0.3	0.2
<i>c,t</i> 12-14	2.3	3.9	3.2	1.6	1.9	2.3
<i>c,t</i> 11-13	10.0	4.5	4.2	4.8	5.0	5.1
<i>t,c</i> 10-12	0.0	0.7	0.2	0.0	0.2	0.5
<i>c,t</i> 9-11	85.7	84.2	82.0	83.5	85.2	80.7
<i>t,c</i> 8-10	0.0	3.2	3.4	3.5	2.9	5.3
<i>c,t</i> 7-9	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0
$\Sigma t,t^1$	3.87	3.59	6.76	4.69	4.19	4.93

Each cheese sample was analysed in duplicate and the results are averaged. ¹ Σ of *t,t* 12-14, *t,t* 11-13, *t,t* 10-12, *t,t* 9-11, *t,t* 8-10, *t,t* 7-9.

Table 3. CLA isomers content in Bouhezza cheese samples (μ g/g fat)*.

CLA isomers	cheese samples					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
<i>t,t</i> 12-14	30.6	6.8	13.4	10.1	7.5	1.0
<i>t,t</i> 11-13	30.8	16.7	27.7	22.7	15.9	3.2
<i>t,t</i> 10-12	0.0	0.0	2.1	4.0	6.3	30.0
<i>t,t</i> 9-11	0.0	0.0	21.2	9.3	3.5	2.9
<i>t,t</i> 8-10	0.0	0.0	8.9	2.1	3.1	3.7
<i>t,t</i> 7-9	0.0	0.0	0.0	5.6	3.0	2.1
<i>c,t</i> 12-14	37.2	25.9	35.1	18.0	17.6	19.6
<i>c,t</i> 11-13	158.1	29.4	45.4	55.0	47.0	44.2
<i>t,c</i> 10-12	0.0	4.3	2.1	0.0	2.3	4.3
<i>c,t</i> 9-11	1359.2	553.1	889.4	956.4	799.2	701.2
<i>t,c</i> 8-10	0.0	20.8	36.5	40.5	27.5	46.0
<i>c,t</i> 7-9	0.0	0.0	0.0	22.3	0.0	0.0
total CLA ¹	1585.1	657.1	1084.6	1146.0	938.2	869.2
$\Sigma t,t^2$	61.4	23.6	73.3	53.8	39.3	42.8

Each cheese sample was analysed in duplicate and the results are averaged. ¹ Total CLA = Σ of all CLA isomers in table. ² Σ of *t,t* 12-14, *t,t* 11-13, *t,t* 10-12, *t,t* 9-11, *t,t* 8-10, *t,t* 7-9.

RDA), of vitamin E (1.5% to 5% RDA) of LNA (3% RDA) and of *cis* 9, *trans* 11 of total CLA (0.8-1% RDA).

Furthermore, according to the U.S. FDA, including Bouhezza cheese into the cream cheese and cheese spread category contains < 3 g of fat per 28 g of the reference amount customarily consumed per eating occasion. Therefore, the low-fat content of Bouhezza cheese adds further value to its healthy properties.

This was a survey study of Bouhezza cheese and further studies will be needed to analyze the impact of different factors on cheese quality. In particular, it would be important to reach a better knowledge of both animal diet and cheese composition from cow, goat and ewe milk. Finally, it would be equally important to know how the traditional cheesemaking technology, thus including cheese ripening into the skin-bag "*chekoua*", may affect the chemical composition and healthy properties of Bouhezza cheese.

Acknowledgements

This research was conducted in the context of the project "Sviluppo della filiera lattiero - casearia in Algeria" sponsored by "Accordo di Programma Quadro Paesi della Sponda Sud del Mediterraneo".

References

- ¹Aissaoui Zitoun, O., Benatallah, L., El H. Ghennam, E. and Zidoune, M. N. 2011. Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened *bouhezza* cheese. *J. Food Agr. Environ.* **9**(2):96-100.
- ²Tudor Kalit, M., Kalit, S. and Havranek, J. 2010. An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mljekarstvo* **60**:149-155.
- ³Mattila-Sandholm, T. and Saarela, M. 2003. *Functional Dairy Products*. CRC Press LLC, New York, 395 p.
- ⁴Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. 2000. Antioxidative factors in milk. *British J. Nutr.* **84**:103-110.
- ⁵Nicoletti, V. G., Marino, V. M., Cuppari, C., Licciardello, D., Patti, D., Purrello, V. S. and Stella, A. M. 2005. Effect of antioxidant diets on mitochondrial gene expression in rat brain during aging. *Neurochem. Res.* **30**:7737-752.
- ⁶Kritchevsky, D. 1992. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease. *Nutr. Today* **27**:30-33.
- ⁷Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H. and Satomi, Y. 2009. Cancer prevention by carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **483**:165-168.
- ⁸Connor, W. E. 2000. Importance of ω -3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**:171-175.
- ⁹Pariza, M. W., Park, Y. and Cook, M. E. 2001. The biologically-active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid. Res.* **40**:283-298.
- ¹⁰Khanal, R. C. 2004. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* **17**:1315-1328.
- ¹¹International Standard 2008. ISO 707. Milk and milk products - Guidance on sampling. 3rd edn. pp. 1-48.
- ¹²APHA 2004. Standard methods for the examination of dairy products. (a) Moisture/solids, Forced Draft Oven, Milk (Class A1), Other products (Class B), pp.449-451. (b) Chloride (Salt) Volhard Method (Class 0), pp.387-389. (c) Acidity, Titratable-Phenolphthalein indicator (Class 0), pp.364-366.
- ¹³International Standard 2008. ISO 3433. Cheese - Determination of fat content - Van Gulik method. 2nd edn. pp.1-12.
- ¹⁴Technical Specification 2008. ISO/TS 17837:2008. Processed cheese products - Determination of nitrogen content and crude protein calculation - Kjeldahl method. pp. 1-20.
- ¹⁵Palozza, P. and Krinsky, N. I. 1992. β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**:184-187.
- ¹⁶Marino, V. M., La Terra, S., Licitra, G. and Carpino, S., 2010. Effetto del trattamento termico sulle sostanze nutraceutiche del latte. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **61**:19-27.
- ¹⁷Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**:497-509.
- ¹⁸Banni, S., Carta, G., Contini, M. S., Angioni, E., Deiana, M., Dessi, M. A., Melis M. P. and Corongiu F. P. 1996. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *J. Nutr. Biochem.* **7**:150-155.
- ¹⁹Hervert-Hernández, D., Sáyo-Ayerdi, S. G. and Goñi, I. 2010. Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.* **58**:3399-406.
- ²⁰Ozgur, M., Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A. and Yılmaz-Ersan, L. 2011. Functional compounds and antioxidant properties of dried green and red peppers. *Afr. J. Agr. Res.* **6**:5638-5644.
- ²¹Lucas, A., Agabriel, C., Martin, B., Ferlay, A., Verdier-Metz, I. and Coulon, J. B. 2006. Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese. *Lait* **86**:177-202.
- ²²Manzi, P., Marconi, S., Di Costanzo, M. G. and Pizzoferrato, L. 2007. Composizione di formaggi DOP italiani. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione* **36**:9-22.
- ²³USDA 2012. National Nutrient database for standard reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page, (www.nal.usda.gov/food-composition/individual-macronutrients-phytonutrients-vitamins-minerals/vitamins-minerals)
- ²⁴Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P. and Doreau, M. 2006. Carotenoids in ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* **131**:418-450.
- ²⁵Food and Nutrition Board, Institute of Medicine 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington, DC.
- ²⁶Gambelli, L., Manzi, P., Panfili, G., Vivanti, V. and Pizzoferrato, L. 1999. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy. *Food Chem.* **66**:353-358.
- ²⁷Seckin, A. K., Gursoy, O., Kinik, O. and Akbulut, N. 2005. Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. *L.W.T.* **38**:909-915.
- ²⁸Hayaloglu, A. A., Cakmakci, S., Brechany, E. Y., Deegan, K. C. and McSweeney, P. L. J. 2007. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Dairy Sci.* **90**:1102-21.
- ²⁹Gun, I. and Simsek, B. 2011. The fatty acid composition of butter stored in sheep's or goat's stomach (Karinyagi). *Food and Nutrition Sci.* **2**:402-406.
- ³⁰Hauswirth, C. B., Scheeder, M. R. L. and Beer, J. H. 2004. High ω -3 fatty acid content in alpine cheese. The basis for an alpine paradox. *Circulation* **109**:103-107.
- ³¹Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **56**:365-79.
- ³²Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S. and Appel L. J. 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**:151-152.
- ³³Werner, S. A., Luedecke, L. O. and Shultz T. D. 1992. Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: effects of cheese cultures, processing, and aging. *J. Agric. Food Chem.* **40**:1817-1821.
- ³⁴Kraft, J., Collomb, M., Möckel, P., Sieber, R. and Jahreis, G. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* **38**:657-664.
- ³⁵Gursoy, O., Seckin, A. K., Kinik, O. and Metin, M. 2003. Conjugated linoleic acid (CLA) content of most popular Turkish hard and soft cheeses. *Milchwissenschaft*, **58**:622-623.
- ³⁶Lin, H., Bovlston, T. D., Chang, M. J., Luedecke, L. O. and Shultz, T. D. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.* **78**:2358-2365.
- ³⁷Bauman, D. E., Barbano, D. M., Dwyer, D. A. and Griinari, J. M. 2000. Technical note: Production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *J. Dairy Sci.* **83**:2422-2425.
- ³⁸Banni, S., Angioni, E., Murru, E., Carta, G., Melis, M. P., Bauman, D., Dong, Y. and Ip, C. 2001. Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. *Nutr. Cancer.* **41**:91-97.
- ³⁹Ip, C., Dong, Y., Ip, M. M., Banni, S., Carta, G., Angioni, E., Murru, E., Spada, S., Melis, M. P. and Saebo, A. 2002. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer* **43**: 52-58.
- ⁴⁰Watkins, B. A. and Li, Y. 2003. CLA in functional food: Enrichment of animal products. In Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adolf, R. (eds). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. AOCS Press, Champaign IL, pp. 174-188.
- ⁴¹Bauman, D.E., Lock, A.L., Corl, B.A, Ip, C., Salter, A.M. and Parodi, P.W. 2008. Milk fatty acids and human health: Potential role of conjugated linoleic acid and *trans* fatty acids. In Sejrnsen, K., Hvelplund, T. and Nielsen, M.O. (eds). *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*. Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp. 529-561.