

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Domaine : S.N.V
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité : Production et Biotechnologie Animales**

THESE

**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT 3^{ème} CYCLE LMD**

Par

M DAHOU Abdelkader El-Amine

THEME

Etude de l'évolution de la flore microbienne indigène d'un fromage industriel à pâte molle type camembert au cours de son affinage et évaluation de ses aptitudes technologiques

Soutenue publiquement le : 02/11/2017

Membres du jury :

DALACHE Fatiha	Professeur	Université de Mostaganem	Présidente
BEKADA Ahmed	Professeur	C .U. Tissemsilet	Directeur de thèse
HOMRANI Abdelkader	Maître de conférence A	Université de Mostaganem	Co-Directeur de thèse
DILMI Bouras Abdelkader	Professeur	Université de Chlef	Examineur
NEMMICHE Said	Maître de conférence A	Université de Mostaganem	Examineur

Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales

Année universitaire 2017 - 2018

DEDICACES

Je tiens à dédier ce travail à

Mon père DAHOU Mokhtar

*Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours. Que Dieu te
donne santé et longue vie*

Ma très chère mère, mes frères et sœurs

Ma chère épouse qui m'a soutenue tout au long de la réalisation de ce travail

Mes trois trésors : Abdelhadi, Imed et Mustapha

Ma belle mère

*Mes collègues et mes proches qui m'ont soutenu tout au long de la réalisation de ce
travail.*

Ma gratitude restera sans limites

REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie « Allah » le tout puissant qui m'a éclairé le chemin de la réussite et m'a donné beaucoup de courage, de la volonté et de la force pour réaliser ce modeste travail.

Cette étude m'a permis d'appliquer des techniques récentes pour l'exploitation de la diversité microbienne lactique dans un fromage industriel, le plaisir des « manips » à la paillasse, de travailler avec des personnes différentes. Et si cette étude existe aujourd'hui, c'est grâce :

A M HOMRANI .A. Directeur du laboratoire des sciences et techniques de production animale, mon co-encadreur qui m'a accueilli au sein du laboratoire je lui témoigne toute ma reconnaissance pour ses conseils avisés, son aide précieuse et sa disponibilité

A M BEKADA .A. Professeur au centre universitaire de Tissemsilet mon encadreur, qui a encadré ce travail, je lui adresse un grand merci pour la confiance témoignée, l'autonomie accordée tout au long du déroulement du travail

Mme DALACHE Fatiha professeur à l'université de Mostaganem de m'avoir fait l'honneur de présider le jury

Je suis particulièrement reconnaissant aux membres du jury, Messieurs

DILMI BOURAS Abdelkader

NEMMICHE Said

d'avoir accepté de juger mon travail, évaluer et examiner cette thèse.

Nous remercions M. SEFARI, le patron de la fromagerie Safilait Constantine, et M. DEDOUCH, Directeur de la fromagerie Tessala Sidi-Belabbès, d'avoir bien voulu mettre à notre disposition les moyens et les échantillons nécessaires à la réalisation de cette étude.

Mes remerciements s'adressent également au Directeur du Laboratoire de recherche en biotechnologie et qualité des aliments université des frères Mentouri Constantine

Monsieur DILMI Smail DG de la SARL HODNA-LAIT et Monsieur CHAOUI Ridha Directeur de la qualité SARL HODNA-LAIT et à toute l'équipe HODNA-LAIT

A tous les doctorants et toutes les doctorantes du laboratoire des sciences et techniques de productions animales de Hassi-Mamèche Mostaganem

Je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cette modeste thèse.

Résumé :

La fabrication des fromages industriels implique l'utilisation d'un microbiote diversifié composé d'une population microbienne endogène naturelle apportée par le lait et l'autre exogène par un ensemencement complémentaire de ferments sélectionnés suivant la technologie utilisée par le fromager. Cette étude se propose d'identifier les populations microbiennes lactiques naturelles du camembert par une approche basée sur la culture des micro-organismes sur des milieux plus ou moins sélectifs, suivi de l'identification phénotypique puis moléculaire des isolats. Ces derniers sont assignés à une espèce puis typés par empreinte génomique par l'application des techniques de typage REP-PCR pour révéler la diversité intra-espèces. Le comportement de la flore lactique est contrôlé par le dénombrement des cellules viables exprimé en UFC/g de fromage qui renseigne sur les variations des niveaux des populations cultivables de chaque espèce causées par les interactions inévitables via les modifications continues du microbiome et de l'écosystème fromager tout au long de l'affinage. Il s'avère que la dominance des espèces bactériennes varie avec le temps d'affinage : 08 espèces ont été identifiées. Les plus répandues et le plus souvent dominantes en début d'affinage sont celles de l'ordre des Streptocoques lactiques 25%, des Lactocoques 22%, des Leuconostocs 20%, des Lactobacilles 15%, des Entérocoques 8%, des Pédicoques 5%, des Microcoques 3% et des Brevibactérium 2%. On observe une croissance séquentielle de certains groupes bactériens par rapport à d'autres où la flore acidifiante est minoritaire et la flore halotolérante rapportée par le lait majoritaire en fin d'affinage. L'identification et le comportement des populations microbiennes sont établis en fonction de la saison, du stade de lactation et du type du traitement thermique spécifique pour une transformation industrielle de type traditionnel ou stabilisé.

Mots clés : microbiote, identification phénotypique, moléculaire, cellules viables

Abstract:

The manufacture of industrial cheese involves the use of a diversified microbiota, composed of endogenous and exogenous microbial populations; the first is a natural endogenous one, made by milk and the second is an exogenous one, made by a supplementary sowing of ferments selected according to the technology used by the cheese maker. This study intends to identify natural acid lactic microbial populations of Camembert cheese through an approach based on the cultivation of microorganisms on more or less selective environments, followed by the identification of phenotypic and molecular isolates. The latter are assigned to a species then typed by genomic imprinting, through the application of the techniques of typing REP - PCR to reveal the intra-species diversity. The behavior of the lactic flora is controlled by the enumeration of viable cells expressed in cfu/g of cheese which provides information on variations in levels of cultivable populations of each species caused by the inevitable interactions via continual changes in the microbiome and cheese ecosystem throughout the refining process. It has been proven that the dominance of bacterial species varies with the time of ripening: 08 species have been identified as the most common and the most dominant at the beginning of ripening. They are the ones following the order of lactic streptococci 25%, Lactococci 22%, Leuconostocs 20%, Lactobacilli 15%, Enterococci 8%, Pediocoques 5%, Micrococcus 3% and Brevibacterium 2%. We have observed sequential growth of some bacterial groups, compared to others in which the acidifying flora is minor and to halotolerant flora reported by the majority of milk at the end of ripening. Identification and behavior of microbial populations are established depending on the season, the stage of lactation and the type of specific heat treatment for industrial processing of a traditional or stabilized type.

Key words: microbiota, phenotypic, molecular identification, viable cells

ملخص :

إنتاج الجبن الصناعي يتم باستخدام تنوع ميكروبي حتمي microbiote يتكون من ميكروبات طبيعية ذاتية مقدمة من الحليب وأخرى خارجية عن طريق زرع مكمل بخمائر وفقاً للتكنولوجيا المستخدمة من قبل حرفيي الجبن. تعترض هذه الدراسة تحديد الهوية المظهرية و الجزيئية للتكوين الميكروبي اللبني الطبيعي للجبن اللين من نوع كمنمبير camembert بنهج قائم على عزل هذه الكائنات الدقيقة الحية باستعمال اوساط انتقائية، وكذا استخدام تقنية بصمة الجينوم اي الكشف التنوع داخل التنوع REP-PCR. تمت مراقبة هذه الكائنات اللبنية بحساب تعداد الخلايا القابلة للبقاء في الجبن التي تقدم معلومات عن التغييرات في مستويات الميكروبات اللبنية الصالحة للزرع لكل نوع من الانواع الناجمة عن التفاعلات القائمة من خلال التغييرات المستمرة للميكروبيوم microbiome الجبني والنظام الايكولوجي الذاتي في كامل مدة تنعيم الكمنمبير. وقد اثبتت الدراسة أن هيمنة الأنواع البكتيرية تختلف مع وقت الانضاج حيث تم تحديد 08 أنواع الأكثر شيوعاً والأكثر هيمنة في بداية التنعيم هم اتباعاً و بالترتيب ستربتوكوكيس اللبني 25%، لكتوكوكيس 22%، ليوكونوستوكس 20%، لكتوبسيل 15%، انتيروكوك 8%، بيديوكوك 5%، ميكروكوك 3% و بريفيباكتيريوم 2%. وقد لاحظنا في نهاية النضج نمو متسلسل من بعض المجموعات البكتيرية التي حملت مع الحليب، مقارنة بالأخرى منها طفيفة الحموضة وذات غالبية المقاومة للملح. تحديد الهوية وسلوك التنوع الميكروبي يتحدد تبعاً للموسم، مرحلة انتاج الحليب، وكذا نوع المعالجة الحرارية للحليب لصناعة الجبن من النوع التقليدي أو المستقر.

الكلمات الرئيسية : تنوع ميكروبي حتمي، تحديد الهوية المظهرية، الجزيئية، خلايا قابلة للبقاء

Liste des tableaux

Tableau 1 : effet des traitements du lait sur sa composition physico-chimique et microbiologique (Canteri G., 1997)

Tableau 2 : Principaux groupes microbiens intervenant au cours de l'affinage du camembert d'après Gori.K et Jespersen.L (2010)

Tableau 3 : Les quatre grandes étapes de la fabrication du fromage Camembert lactique fait de lait pasteurisé et les paramètres technologiques généraux associés à chacune d'elles. (Eck et al., 2006)

Tableau 4 : Teneurs moyennes en acides gras des différentes catégories de fromages (Cholet O., 2006)

Tableau 5 : Valeurs moyennes de l'indice de maturation en fin d'affinage pour les différentes catégories de fromages (Desmazeaud et al., 1979)

Tableau 6 : Evolution de la composition du camembert en cours d'affinage

Tableau 7 : Critères morphologiques d'identification des genres présumés des souches lactiques et halotolérantes

Tableau 8 : Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des souches

Tableau 9 : Séquence des amorces utilisées en PCR de la firme Qbiogène Research Service France

Tableau 10 : Mélange réactionnel de la PCR

Tableau 11 : Programme établi pour l'amplification PCR par le thermocycleur Hybaid

Tableau 12 : Souches employées pour établir l'arbre phylogénétique en utilisant les séquences de leurs gènes 16S rRNA

Tableau 13 : Microbiote sélectionné pour l'essai de fabrication industrielle

Tableau 14 : Incidence moyenne des bactéries lactiques isolées dans le fromage industriel de type traditionnel fabriqué avec du lait de vache thermisé à 63°C de la fromagerie Tessala Sidi-Belabbès durant les 03 périodes de lactation (* unité : g/100g)

Tableau 15 : Incidence moyenne des bactéries lactiques isolées dans le fromage industriel de type stabilisé fabriqué avec du lait de vache pasteurisé à 72°C de la fromagerie Safilait Constantine durant les 03 périodes de lactation (* unité : g/100g)

Tableau 16 : Nombre d'isolats purifiés par espèce apparentée durant les trois périodes de lactation sur les deux fromages industriels de type traditionnel et stabilisé

Tableau 17 : Coloration de gram et tests d'oxydo-réduction des souches bactériennes identifiées

Tableau 18 : Résultats des identifications par galeries API

Tableau 19 : Bilan des espèces bactériennes identifiées phénotypiquement par les galeries API

Tableau 20 : Identification des 104 isolats par les galeries API

Tableau 21 : Identification des bactéries lactiques et halotolérantes d'affinage isolées des fromages en basse lactation par la technique de l'ARNr16s

Tableau 22 : Identification des bactéries lactiques et halotolérantes d'affinage isolées des fromages en moyenne lactation par la technique de l'ARNr16s

Tableau 23 : Identification des bactéries lactiques et halotolérantes d'affinage isolées des fromages en haute lactation par la technique de l'ARNr16s

Tableau 24 : Etude de quelques aptitudes technologiques et profil fermentaire des espèces identifiées

Tableau 25 : Activité inhibitrice des souches lactiques identifiées vis-à-vis des germes indicatrices pathogènes et d'altération

Tableau 26 : Résultats du test de dégustation J+12

Tableau 27 : Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'essai de fabrication du camembert industriel

Tableau 28 : Fiche d'analyse sensorielle comparative des fromages

Listes des figures

Figure 1 : Micro-filtration du lait (Laithier, 2011)

Figure 2 : Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques (Salminen et *al.*, 2004).
A: Homofermentation, B: Hétérofermentation

Figure 3: Evolution des 08 espèces bactériennes lactiques sur le fromage industriel traditionnel

Figure 4: Evolution des 08 espèces bactériennes lactiques sur le fromage industriel stabilisé

Figure 5 : Cellules viables à J+2 pour le fromage industriel de type traditionnel

Figure 6 : Cellules viables à J+12 pour le fromage industriel de type traditionnel

Figure 7 : Cellules viables à J+2 dans le fromage industriel de type stabilisé

Figure 8 : Cellules viables à J+12 dans le fromage industriel de type stabilisé

Figure 9 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactococcus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

Figure 10 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactococcus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Figure 11 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactobacillus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

Figure 12 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactobacillus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Figure 13 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Leuconostoc* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

Figure 14 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Leuconostoc* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Figure 15 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Enterococcus* et *Streptococcus thermophilus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

Figure 16 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Enterococcus* et *Streptococcus thermophilus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Figure 17 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Pediococcus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

Figure 18 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Pediococcus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Figure 19: Pouvoir protéolytique chez certaines espèces de bactéries lactiques et halotolérantes

Figure 20: Pouvoir lipolytique chez certaines espèces de bactéries halotolérantes

Figure 21: Aspect des colonies gluantes sur milieu hypersaccharosé

Figure 22 : Production de l'acétoïne par les isolats de bactéries lactiques

Figure 23: Activité inhibitrice des espèces identifiées sur des bactéries indicatrices pathogènes et d'altération

Figure 24 : Aspect visuel du camembert de l'essai industriel par rapport au témoin

Liste des abréviations

1 / Noms de genres bactériens :

Lc : *Lactococcus*

Lb : *Lactobacillus*

Leuc : *Leuconostoc*

Ped : *Pediococcus*

Ent : *Enterococcus*

St : *Streptococcus*

Mic : *Micrococcus*

Br : *Brevibacterium*

Sp : Espèce non précisée

Subsp : Sous espèce

2/ Unités de mesures :

°C : Degré celsius

°D : Degré dornic

L, ml, ul : Litre, millilitre, microlitre

Qsp : Quantité suffisante pour

Rpm : Rotation par minute

Tr / mn : Tours-minutes

ufc/ml : Unité formant colonie par millilitre

ufc/g : Unité formant colonie par gramme

3/ Autres abréviations :

Acide lactique L et D : Molécule d'acide lactique chirale se présente dans sous forme de deux

énantiomères (hydroxyle asymétrique) :

(R) –acide lactique ou D(-) acide lactique

(S)-acide lactique ou L(+) acide lactique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNr 16S : Chez les procaryotes : petite sous unité du ribosome (30S) impliqué dans la lecture

de l'ARN messenger

ARNr 18S : Chez les eucaryotes : petite sous unité du ribosome (40S) impliqué dans la lecture

de l'ARN messenger

ARNr 23S : Chez les procaryotes grande sous unité du ribosome (50S) impliqué dans la

formation des liaisons peptidiques

BEA : Bile Esculine Azide de sodium

CO₂ : Gaz carbonique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

C₂ et C₈ : Carbone 2 et carbone 8

EPS : Exopolysaccharides

E.S.T : Extrait sec total

G+C : Guanine + Cytosine

G.T.P : Guanosine triphosphate

A.T.P : Adénosine triphosphate

C.T.P : Cytidine triphosphate

N.T.P : Nucléoside triphosphate

MRS : Milieu Man Rogosa et Sharp

M17 : Milieu lactose d'isolement des lactocoques

N.S.L.A.B : Non Starter Lactic Acid Bacteria

OMS: Organisation mondiale de la santé

PH: Power of hydrogen: potentiel hydrogène

REP-PCR : Repetitive element polymerase chain reaction (pour l'empreinte ADN)

A.O.C : Appellation d'origine contrôlée

A.O.P : Appellation d'origine protégée

H.F.D : Humidité du fromage dégraissé

G.D.L : Gluconodeltalactone (agent acidogène de maturation des laits)

C.E.P : Courant électrique pulsé

G.R.A.S : Generally regarded as safe

Gélose FTO : Gélose au nitrofurane développée par Curry et Borobian en 1976

Gélose FP : Gélose au furazolidone développée par Rheinbaben et Hadlok en 1981

P.T.S : Système phosphotransférase

H.R : Humidité relative

M.A.P : Matière azotée protéique

D.O : Densité optique

I.D : Identification

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Abstract

Les tableaux

Les figures

Liste des abréviations

Introduction générale 17

Chapitre I - Synthèse bibliographique :

1. Procédés de fabrication fromagère 19

1.1 L'industrie fromagère..... 19

1.2 Les traitements du lait pour la fabrication fromagère..... 19

1.2.1 La pasteurisation..... 21

1.2.2 La thermisation..... 21

1.2.3 La microfiltration..... 21

1.2.4 La bactofugation..... 22

1.2.5 Les courants électriques pulsés..... 22

1.2.6 Enrichissement du lait avec des micro-organismes d'intérêt
technologique..... 22

1.3 Standardisation physico-chimique et biologique des laits..... 23

1.3.1 Standardisation physico-chimique..... 24

1.3.2 Standardisation biologique..... 24

1.4 Coagulation..... 26

1.4.1 Coagulation acide..... 26

1.4.2 Coagulation par voie enzymatique..... 26

1.5 Egouttage..... 27

1.5.1 Egouttage du gel lactique..... 27

1.5.2 Egouttage du gel présure et du gel mixte..... 27

1.5.3 Facteurs d'égouttage..... 28

1.6 Salage..... 28

1.7 Maturation des fromages 28

1.8 Le fromage à pâte molle type camembert..... 33

1.8.1 Définition..... 33

1.8.2 Les étapes clés de la fabrication du camembert..... 33

2. Affinage des fromages.....	35
2.1 Les mécanismes de l’affinage.....	35
2.2 Enzymes intervenant dans l’affinage.....	36
2.2.1 Enzymes naturelles du lait.....	36
2.2.2 Enzymes d’origine microbienne.....	37
2.2.3 Enzymes d’origine exogène.....	37
2.3 Les transformations du substrat pendant l’affinage.....	37
2.4 Modalités de l’affinage.....	39
2.4.1 Rôle du PH.....	39
2.4.2 Rôle de l’activité de l’eau « aw ».....	40
2.4.3 Rôle de la température.....	43
2.4.4 Rôle de la composition de l’air.....	44
3. Les flores microbiennes du lait cru au fromage.....	45
3.1 Origine des micro-organismes.....	45
3.2 Pré-existence avant la transformation de la matière première (microflores indigènes ou originelles).....	45
3.3 Apport accidentel lors de la transformation de la matière brute.....	45
3.4 Addition volontaire.....	46
3.5 Les microflores utiles et leurs rôles.....	46
3.5.1 Les bactéries lactiques	46
3.5.1.1 Définition	46
3.5.1.2 Caractères généraux des bactéries lactiques.....	47
3.5.1.3 Taxonomie des bactéries lactiques.....	47
3.5.1.3.1 Le genre <i>Streptococcus</i>	47
3.5.1.3.2 Le genre <i>Enterococcus</i>	48
3.5.1.3.3 Le genre <i>Lactobacillus</i>	48
3.5.1.3.4 Le genre <i>Lactococcus</i>	49
3.5.1.3.5 Le genre <i>Leuconostoc</i>	49
3.5.1.3.6 Le genre <i>Pediococcus</i>	50
3.5.1.4 Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques.....	51
3.5.1.5 Rôle des bactéries lactiques.....	52
3.5.2 Les microflores d’affinage ou microflore de surface.....	53
3.5.2.1 Les bactéries d’affinage halotolérantes.....	53
3.5.2.1.1 <i>Micrococcus</i>	54
3.5.2.1.2 <i>Brevibacterium</i>	56

4. Les métabolismes et interactions des souches de bactériennes destinées à la transformation fromagère.....	57
4.1 Métabolisme des sucres.....	57
4.2 Métabolisme des protéines.....	59
4.3 Métabolisme des lipides.....	60
4.4 Aptitude aromatisante.....	60
4.5 Rôle dans la conservation.....	60
4.6 Production d'acides et diminution du PH.....	60
4.7 Production de peroxyde d'hydrogène.....	61
4.8 Production de bactériocines.....	61
4.9 Interactions entre les souches bactériennes.....	61
4.10 Cultures bactériennes mixtes.....	62
5. Méthodes de caractérisation de l'écosystème microbien des fromages.....	63
5.1 Caractérisation de la diversité phénotypique.....	64
5.2 Caractérisation de la diversité génotypique	64
5.2.1 L'analyse plasmidique.....	64
5.2.2 RFLP.....	64
5.2.3 PFGE.....	64
5.2.4 RADP.....	65
5.3 Séquençage des génomes et annotation.....	66
5.3.1 Génomique comparative.....	67
5.3.2 Comparaison bio-informatique.....	67

Chapitre II - Matériel et méthodes

1. Méthodologie	68
1.1 Provenance des échantillons	68
1.2 Diagramme de fabrication des 02 fromageries	68
2. Analyses microbiologiques	70
2.1. Dénombrement microbien	70
2.1.1 Flore totale	70

2.1.2 La flore lactique.....	70
2.1.3 La flore halotolérante.....	71
3. Isolement et purification des isolats	71
4. Détermination de la concentration en cellules viables.....	73
5. Identification phénotypique des isolats purifiés par les galeries API Biomérieux.....	74
6. Identification génotypique des isolats purifiés.....	75
7. Etude de quelques aptitudes technologiques de la flore indigène isolée.....	80
7.1. Pouvoir acidifiant.....	80
7.2. Pouvoir protéolytique.....	80
7.3. Pouvoir lipolytique.....	80
7.4. Pouvoir texturant : Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée.....	80
7.5. Pouvoir aromatisant.....	81
7.6. Activité antibactérienne.....	81
8. Essai de fabrication industrielle avec les isolats purifiés : Fromage fabriqué avec un microbiote contrôlé.....	82
 Chapitre III - Résultats et discussions	
1. Dénombrement bactérien.....	83
2. Isolement et purification des isolats	86
3. Détermination de la concentration en cellules viables.....	88
4. Identification phénotypique des isolats purifiés par les galeries API Biomérieux.....	90
5. Identification génotypique des isolats purifiés.....	95
6. Etude de quelques aptitudes technologiques de la flore indigène isolée.....	98
7. Essai de fabrication industrielle d'un fromage à pâte molle type camembert avec les isolats purifiés : Fromage fabriqué avec un microbiote contrôlé.....	111
8. Qualité organoleptique de l'essai du camembert industriel.....	113
9. Conclusion partielle.....	114
Conclusion générale.....	115
Références bibliographiques	116
Annexes.....	126
Liste des communications et des publications.....	138

Introduction générale

Selon son intérêt et ses conséquences en fromagerie, la flore microbienne, présente dans le lait en fin de traite, est définie essentiellement par les méthodes d'élevage, de traite et sa conduite ainsi que le traitement thermique modéré par une simple thermisation ou moins sévère par une pasteurisation LTST (Low temperature short time) qui ne la détruit pas complètement. Cette flore est en fait un paramètre nécessaire au maintien du potentiel technologique du lait pour sa transformation en fromage et joue un rôle important dans la qualité des fromages sur le plan organoleptique et, en particulier, sur le plan gustatif (**Meribai et al., 2017 ; Laithier 2011 ; Delbès et al., 2015 ; Depouilly et al., 2004**). Elle permet ainsi de préserver la typicité et une certaine diversité sensorielle des fromages. Par ailleurs, en Algérie, la fabrication industrielle fromagère des pâtes molles utilise une flore lactique de souches acidifiantes mésophiles pour la technologie traditionnelle et de souches majoritairement thermophiles pour la technologie de type stabilisé ; la proportion de ces souches varie au cours de l'affinage, ainsi certaines souches sont présentes, alors que d'autres se succèdent au fil du temps. C'est dans ce contexte qu'on abordera cette étude pour le suivi de cette dynamique des populations bactériennes caractérisant nos échantillons de fromages à pâte molle type camembert marquée par l'importance quantitative des populations des bactéries lactiques apportées (Streptocoques), des bactéries indigènes (Lactocoques, Leuconostocs) et des bactéries halotolérantes (Microcoques, bactéries corynéformes). Traditionnellement, le processus d'affinage des fromages et l'élaboration des qualités organoleptiques étaient exclusivement assurés par les communautés microbiennes naturelles présentes dans le lait. Actuellement et industriellement, lorsque les laits sont épurés en micro-organismes par des traitements thermiques (pasteurisation-thermisation), physiques (micro-filtration-bactofugation) et par les courants électriques pulsés à forte intensité, l'ensemencement microbien exogène du lait est devenu indispensable. C'est alors que l'innovation technologique de traitement du lait, loin de la tradition, s'impose pour faciliter la maîtrise des populations microbiennes d'une part et l'uniformisation et la standardisation des caractéristiques sensorielles des fromages d'autre part. (**Callon et al., 2004 ; Gori et al., 2010 ; Leclercq-Perlat et al., 2004 ; Montel et al., 2003 ; St-Gelais et al., 2002**)

La fabrication d'un camembert implique l'utilisation seulement d'un microbiote endogène apporté par le lait ou complété par un exogène apporté par le fromager aux propriétés biochimiques très ciblées et pour la production de composés sapides et aromatiques en équilibre contrôlé responsable de la flaveur (odeur, arôme et saveur) des fromages. Ce microbiote exprime ces potentialités enzymatiques intrinsèques en fonction de l'environnement biotique, siège de nombreuses interactions entre les micro-organismes mais aussi de l'environnement abiotique dans le quel intervient les facteurs physico-chimiques (**Monnet et al., 2012 ; Leclercq-Perlat et al., 2011 ; Raynaud et al., 2016**)

Cette étude s'est limitée à une première caractérisation de la flore bactérienne dominante de deux camemberts industriels, l'un de type traditionnel issu d'un lait thermisé, l'autre de type stabilisé obtenu à partir d'un lait pasteurisé, à diverses étapes de l'affinage par la mise au point de milieux de culture appropriés, nécessaires pour l'inventaire de souches lactiques représentatives et des genres parfois mal définis dont ceux de la flore halotolérante.

Cette étude, réalisée au laboratoire des sciences et techniques de production animale de Hassi-Mamèche (Mostaganem) et dont la transformation et l'échantillonnage ont lieu dans 02 fromageries industrielles, celle de Safilait (Constantine) avec une technologie industrielle de type stabilisé et celle du Tessala (Sidi-Belabbès) avec une technologie industrielle de type traditionnel.

La problématique soulevée dans cette étude consiste en la reconnaissance et la gestion de la dynamique des communautés bactériennes au cours de l'affinage par analyse des risques – bénéfiques nécessaire au respect des valeurs gastronomiques, la santé et le patrimoine microbien, indispensables pour la délivrance d'une appellation d'origine contrôlée soit un label officiel de protection du fromage lié à son origine géographique et à ces caractéristiques de fabrication et surtout de son affinage. Originalité issue d'un terroir et d'un savoir-faire particulier.

Les objectifs recherchés à travers cette recherche peuvent être résumés comme suit :

- Quantifier la microflore bactérienne initiale des échantillons des fromages à pâte molle type camembert sur le caillé au démoulage.
- Mettre en évidence l'évolution de cette microflore au cours de l'affinage.
- Scinder la communauté bactérienne entre indigène et celle apportée avec une approche sur son évolution par la détermination de la concentration en cellules viables.
- Mettre en évidence les interactions bactériennes entre les différentes souches isolées.
- Détection et développement dans le cadre de ce projet de nouvelles souches ayant de très bonnes aptitudes fromagères nécessaires à la création d'un soucier national.

Chapitre I – Synthèse Bibliographique

1. Procédés de fabrication fromagère

1.1 L'industrie fromagère

Il existe une très grande variété de fromages selon la nature du lait et les technologies mises en œuvre.

La dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. (Eck *et al.*, 2006)

La fabrication de fromages comprend 5 grandes phases :

- Traitement thermique
- Standardisation
- Coagulation
- Egouttage
- Affinage

1.2 Les traitements du lait pour la fabrication fromagère:

Les traitements du lait s'avèrent indispensables dès qu'il y a stockage, collecte ou transport non seulement pour des questions sanitaires mais aussi pour assurer l'assemblage des différents laits par rapport à la définition du goût de référence.

Les traitements du lait n'intéressent donc que les industriels et sont à l'origine de la nécessité de redéfinition de la notion de lait cru.

Il importe de connaître les effets des différents traitements sur les composés physico-chimiques et microbiologiques du lait pour déterminer leur influence et leur acceptabilité en terme d'AOC eu égard à la définition du goût du consommateur, du respect du lien au terroir et des pratiques traditionnelles de production.

Le tableau ci-dessous nous permet d'y répondre

Tableau 1 : effet des traitements du lait sur sa composition physico-chimique et microbiologique (Canteri G., 1997)

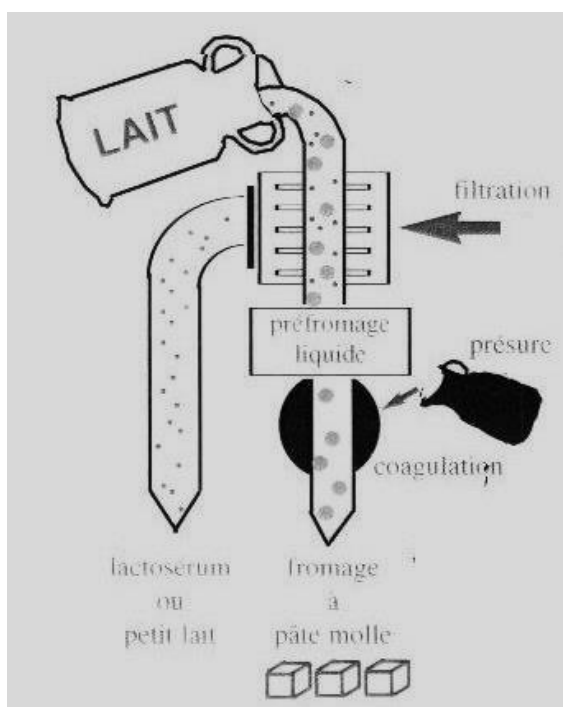
Traitements	Thermisation	Pasteurisation Basse	Pasteurisation haute 90/95°C	Bacto-fugation	Micro-filtration	C.E.P
Protéines :						
Caséines	Intactes	Augmentation taille micelles	Association entre la caséine kappa et la béta lactoglobuline	Grosses micelles de caséines séparées	Intactes	Intactes
Protéines solubles : Alpha-lactoglobuline	Dénaturation partielle	Dénaturation partielle			Intactes	Intactes
Béta-lactoglobuline	Intactes	Dénaturation partielle		Perte de 1gr/Litre	Intactes	Intactes
Matières grasses :						
Glycérides	Intactes	Intactes	Intactes	Intactes	Intactes	Intactes
Acides gras libres	Intactes	Intactes	Intactes	Intactes	Intactes	Intactes
Sels minéraux :						
Calcium soluble	Partiellement colloidal	Partiellement colloidal	Partiellement colloidal	Calcium colloidal sur des grosses micelles séparées avec une perte de 0,25 mg/L	Intactes	Intactes
Colloidal	Intacte	Partiellement insoluble	Partiellement insoluble			
Insoluble	Intacte	Intacte	Intacte			
Vitamines :						
Hydrosolubles	Intactes	Détruites	Détruites	Intactes	Intactes	Intactes
Liposolubles	Intactes	Détruites	Détruites	Intactes	Intactes	Intactes
Enzymes :						
Phosphatase	Intacte	Détruite	Détruite	Intacte	Intacte	Intacte
Lipase naturelle	Partiellement intacte	Inactivée	Inactivée	Intacte	Intacte	Intacte
Lipase microbienne	Intacte	Intacte	Inactivée	Intacte	Intacte	Intacte
Protéase acide	Intacte	Inactivée	Détruite	Intacte	Intacte	Intacte
Protéase alcaline	Intacte	Inactivée	Détruite	Intacte	Intacte	Intacte
Microbiologie	Elimination des coliformes	Elimination 92 à 97% de la flore microbienne	Elimination de 97% avec résistance de certains thermorésistants et des spores	Elimination des spores à 85/90%	Elimination à 99,8%	Elimination à 95%

Il nous semble intéressant de définir ces traitements avant de proposer certaines conclusions à valider par les professionnels et les autorités compétentes.

1.2.1 **La Pasteurisation** est un traitement thermique qui permet l'élimination des bactéries sensibles à des températures comprises entre 72 et 75 ° C pendant 20 secondes. La pasteurisation haute atteint les 90 à 95 ° C. "L'analyse sensorielle a mis en lumière les grandes différences de saveur entre fromages au lait cru et fromages au lait pasteurisé". (**Berodier A., 2005**)

1.2.2 **La Thermisation** est un procédé moins intense que la pasteurisation qui consiste à éliminer les bactéries sensibles à des températures comprises entre 62 et 65 ° C.

1.2.3 **La Microfiltration** est un procédé de filtration qui sépare physiquement les bactéries du lait par passage à travers une membrane poreuse céramique, des micro-filtres. Cette technique d'assainissement permet la rétention des cellules somatiques et élimine 99.9% de la flore microbienne native.



Elle s'opère entre 37° et 50°C. Du fait que les globules gras peuvent obturer la membrane, elle nécessite une étape préliminaire d'écémage, et, par conséquent, une étape ultérieure de réincorporation de matière grasse. La phase grasse réincorporée peut être apportée :

- soit par de la crème ou des laits entiers pasteurisés, on parle alors de "microfiltration chaude",
- soit par de la crème ou du lait entier crus, on parle alors de "microfiltration froide".

La microfiltration à froid a obtenu un avis favorable sous certaines conditions, en 2002 par le Conseil National de l'Alimentation.

Figure 1 : Micro-filtration du lait (Laithier, 2011)

Ce procédé nous paraît acceptable pour la maîtrise des risques puisqu'il ramène le lait au stade inerte mais impose une reconstitution de la structure physico-chimique et un réensemencement complet des composés microbiologiques à partir d'éléments qui ne doivent avoir subi aucun traitement pour être accepté. (**Beuvier F. et Feutry F., 2005**)

Mais il ne saurait permettre de dénommer les produits en résultant, «fromages au lait cru» sans qualificatif.

Il est presque possible aujourd'hui, après avoir microfiltré, de retrouver le goût final grâce à l'ajout de bactéries utiles", explique **Beuvier et al., 2004** « Mais il y a un risque certain d'uniformisation, car la diversité organoleptique diminue », dit les chercheurs, qui tiennent à rappeler que les risques sanitaires sont "statistiquement infimes" et que beaucoup de progrès ont été faits concernant l'hygiène.

La synérèse (vitesse d'égouttage du lactosérum) est sensible à la température de pasteurisation, une augmentation de cette température se traduisant par une augmentation de la synérèse. En utilisant les mêmes procédés de fabrication pour des laits pasteurisés ou non, on aboutira à un produit plus riche en eau dans le produit pasteurisé. Il faut aussi noter que les laits présentant un niveau faible de bactéries ont tendance à produire un meilleur caillé que ceux des laits de ramassage, ce qui est une raison supplémentaire de la nécessité d'avoir un lait très propre pour la fabrication du fromage. (**Ramet J., 2009**)

Les procédés Pasteurisation, Thermisation et Microfiltration à chaud restent incompatibles compte tenu des niveaux de température.

Pour information, 2 techniques dont on parle moins ...

1.2.4 La Bactofugation est un procédé qui utilise la force centrifuge pour séparer certains micro-organismes du lait.

1.2.5 Les Courants Electriques Pulsés. Ce procédé consiste à faire passer le champ dans une tuyauterie où il est soumis à des chocs électriques, des impulsions de courte durée et de forte intensité.

1.2.6 Enrichissement du lait avec des micro-organismes d'intérêt technologique

L'ensemencement exogène devient indispensable dans les productions fromagères industrielles compte tenu de l'appauvrissement du lait en micro-organismes (**Eck, 2006**).

L'ensemencement exogène repose sur l'exploitation de collections de souches microbiennes. Celles-ci sont généralement constituées d'isolats (colonies capables de se développer sur un milieu de culture de laboratoire donné), dont la carte d'identité (morphologie, aspect, profil génomique) va être établie pour leur donner un nom d'espèces et les caractériser par leur capacité acidifiante et leurs diverses potentialités enzymatiques (dégradation des substrats, production de molécules aromatiques).

Ils permettent de sélectionner les souches qui, à priori, sont les plus aptes à conférer aux fromages les caractéristiques souhaitées : texture fine, ferme ou onctueuse, arômes développés, etc.

Les bactéries lactiques doivent être obligatoirement présentes dans le lait à des niveaux de population élevés pour acidifier plus ou moins rapidement en fonction des technologies fromagères.

Des levains lactiques, recherchés essentiellement pour leurs propriétés acidifiantes, sont ainsi ensemencés : entre 10³ et 10⁶ cellules bactériennes/millilitre de lait, suivant la nature du micro-organisme et le type de technologie (**Roissard et Luquet.,1985 ; St-Gelais et al.,2002 ; Aissaoui et al., 2006 ; Mozzi et al., 2010**).

De composition définie, souvent commercialisés sous forme de ferments, ils sont constitués d'un nombre limité de souches de deux ou plusieurs espèces de bactéries lactiques thermophiles, supportant la chaleur (*Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*,

etc.), ou mésophiles, pour lesquelles la température ne doit pas dépasser 35 °C (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, etc.).

L'ensemencement peut être nécessaire dans certains laits crus, trop faiblement chargés en micro-organismes. Il existe également des levains lactiques de composition non définie, dont le nombre de souches est inconnu et qui dérivent de productions artisanales sélectionnées pour la qualité de leurs produits.

Outre les bactéries acidifiantes, d'autres bactéries, des levures, des moisissures peuvent être ajoutées dans le lait en fonction des technologies fromagères.

L'ensemencement de levures, tel *Geotrichum candidum*, est courant dans la fabrication du camembert et des fromages de chèvre.

1.3 Standardisation physico-chimique et biologique des laits

La qualité du lait de fromagerie peut être définie comme l'aptitude à donner un bon fromage dans des conditions normales de travail avec un rendement satisfaisant.

La standardisation biologique par traitement thermique, bactofugation ou microfiltration, suivie de l'addition d'une flore contrôlée permet de s'affranchir de la flore originelle des laits réfrigérés présentant une flore indésirable (psychrotrophes, germes pathogènes) et de favoriser la production de facteurs de croissance pour une acidification biologique régulière (**Verdiez-Metz et al., 2009**)

1.3.1 Standardisation physico-chimique

Les « standards » définis par les technologues concernent la composition et les caractéristiques physico-chimiques du lait à mettre en œuvre : matières azotées protéiques, matière grasse, équilibre minéral, pH, lactose.

1.3.2 Standardisation biologique

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans les différentes étapes de la transformation du lait en fromage. Par la production d'acide lactique, elles abaissent le pH et contribuent avec les enzymes coagulantes à modifier les caractéristiques physico-chimiques du milieu et contribuent à la texture particulière de chaque type de fromage. Elles préparent les conditions de développement des ferments d'affinage (moisissures, levures, corynébactéries, ferments propioniques, etc.). Par leurs activités aromatiques et protéolytiques, elles participent à l'affinage des fromages et déterminent leurs caractéristiques organoleptiques.

En dehors des fromages au lait cru AOC (appellation d'origine contrôlée), dont les laits collectés journallement ont une excellente qualité bactériologique, les industriels effectuent des traitements thermiques sur les laits réfrigérés afin de détruire la flore et les enzymes ou inhibiteurs indésirables pour mieux contrôler les étapes des grandes fabrications.

Mais ces traitements thermiques (63-65 °C/15-20 s ou 72 °C/20-30 s) affectent non seulement la flore originelle du lait cru, mais aussi ses propriétés technologiques (perte de l'aptitude à la coagulation, diminution du potentiel biologique). Certaines techniques comme la

bactofugation ou la microfiltration tangentielle peuvent se substituer aux traitements thermiques en éliminant à température modérée (30-50 °C) 95 à 99% de la flore originelle du lait, dont les Clostridia, sans altérer les propriétés technologiques. Cependant, ces techniques conduisent, comme dans le cas des traitements thermiques, à une réduction du potentiel biologique (Leveau et al., 1993 et Lortal et al., 2005).

L'objectif de l'industriel en terme de standardisation biologique est donc de :

- rétablir les aptitudes du lait à la coagulation
- favoriser la production de facteurs de croissance pour une acidification biologique régulière et/ou par addition de bactéries thermo choquées qui apportent un potentiel enzymatique
- amener le pH d'emprésurage à la valeur désirée

Selon les caractéristiques des laits collectés, le fromager dispose de plusieurs leviers : traitements thermiques, choix des levains, température de report et pH d'emprésurage du lait.

Les bactéries lactiques utilisées sont essentiellement homofermentaires (*Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp cremoris*). Le lait peut être aussiensemencé en microorganismes ayant un rôle dans l'affinage (microcoques, lactobacilles mésophiles, corynébactéries). L'addition des levains après le traitement thermique en maturation chaude (30-35 °C pendant 1 ou 2 heures) a pour rôle d'acidifier le lait au pH d'emprésurage désiré et de diriger l'acidification pendant la phase d'égouttage. Cette étape est importante car elle conditionne le degré de minéralisation et l'extrait sec de la pâte du fromage.

Les bactéries lactiques peuvent être mésophiles, hétérofermentaires, homofermentaires ou thermophiles selon les technologies mises en œuvre. Leurs équipements enzymatiques endo- et exocellulaires participent à l'affinage du fromage.

Cependant, la conduite de la prématuration pour l'obtention du pH d'emprésurage reste une variable qui n'est pas toujours bien maîtrisée ; aussi, un certain nombre de fromagers pratiquent actuellement, une acidification dirigée pour l'obtention du pH d'emprésurage par l'emploi de GDL, CO₂, protéines sériques ou résines échangeuses d'ions.

La microflore lactique doit être présente dans le lait avant l'emprésurage. Dans le cas des laits crus pour la fabrication de fromages AOC, il est parfois pratiqué avant ensemencement une maturation « sauvage » à 12-15 °C pendant 15-16 heures qui favorise le développement des bactéries lactiques originelles du lait.

Dans le cas des laits pasteurisés l'enrichissement peut se faire selon 3 types d'ensemencement :

- les levains traditionnels ;
- ensemencement en cuve à levain ;
- ensemencement direct du lait de fabrication.

Un facteur limitant dans le développement de la standardisation des laits est une méconnaissance et une non maîtrise des équipements enzymatiques du lait, de la flore originelle et des levains utilisés (**Mahaut et al., 2011 ; Montel et al., 2005**)

1.4 Coagulation

La coagulation résulte d'un changement irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi-solide appelé gel ou coagulum. Les caractéristiques physico-chimiques du gel conditionnent l'aptitude à l'égouttage et les caractéristiques finales du fromage. (**Casalta E., 2003**)

1.4.1 Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi = 4.6) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de CO₂ ou addition de GDL) ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide.

L'acidification entraîne une diminution des charges négatives des micelles et donc une diminution de la couche d'hydratation et des répulsions électrostatiques, ainsi qu'une solubilisation du calcium et du phosphore minéral, entraînant une déstructuration des micelles de caséine avec réorganisation protéique, pour former un réseau puis un gel à pH = 4.6.

C'est un gel qui présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. Les liaisons sont de faible énergie de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques (**Choisy et al., 1997**).

1.4.2 Coagulation par voie enzymatique

Elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes protéolytiques, le plus souvent d'origine animale (**Eigel et al., 2001 ; Laithier C., 2011**).

On distingue 3 phases:

- phase primaire ou enzymatique ;
- phase secondaire ou d'agrégation des micelles déstabilisées ;
- phase tertiaire ou phase de réticulation.

Un certain nombre d'enzymes d'origine microbienne ont la propriété de coaguler le lait : enzymes de certaines moisissures (*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) ou de 02 bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*).

Cependant, la plus couramment utilisée est la présure sécrétée par la caillette des jeunes ruminants non sevrés.

1.5 Egouttage

Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique. Cette élimination du lactosérum sera plus ou moins rapide selon la nature et l'histoire du coagulum (**Leclercq-Perlat M.N.,2011 et Hutkins R.W.,2006**).

L'égouttage commence dans les cuves de coagulation, se poursuit dans les moules, puis dans les hâloirs.

Le gel formé par acidification et/ou par action de la présure constitue un état physique instable.

1.5.1 Egouttage du gel lactique

L'égouttage spontané d'un gel lactique est lent et conduit à un caillé hétérogène, présentant des teneurs en matières sèches peu élevées compte tenu d'un faible égouttage dû à une structure déminéralisée.

1.5.2 Egouttage du gel présure et du gel mixte

Le gel présure présente une cohésion, une élasticité et une porosité fortes, mais une perméabilité faible. Afin d'obtenir un caillé présentant une teneur élevée en matières sèches, il est nécessaire de mettre en œuvre un certain nombre d'opérations telles que le tranchage, le brassage, le chauffage, le pressage, le salage et le ressuyage (**Eck et al., 2006**).

Les phases d'égouttage et d'acidification ont une place importante sur le mode d'obtention des caillés lactique et présure, puisqu'elles régulent deux facteurs importants qui sont l'humidité du fromage dégraissé (HFD) et le pH.

Ces deux facteurs jouent un rôle dans l'orientation de la croissance microbienne et dans le développement des réactions enzymatiques et biochimiques au cours de l'affinage des caillés. Selon le mode d'acidification et d'égouttage des caillés, on distingue 4 grandes classes de fromages :

- les caillés lactiques qui restent très humides (pâte fraîche) ;
- les caillés mixtes à dominance lactique (pâte molle) ;
- les caillés mixtes à dominante présure (pâte pressée non cuite) ;
- les caillés présures de type pâte dure et pâte pressée cuite.

1.5.3 Facteurs d'égouttage

La maîtrise des facteurs d'égouttage permet d'agir sur les quantités d'eau et de solutés évacués du coagulum.

1.5.3.1 Tranchage

Le tranchage consiste à découper le gel en portions égales et plus ou moins grandes afin d'augmenter la surface d'exsudation du lactosérum.

1.5.3.2 Brassage

Le brassage évite la soudure du grain de caillé en maintenant libres les surfaces d'échanges.

L'acidification développée par les ferments lactiques au cours de la fabrication entraîne une diminution de l'électronégativité des caséines conduisant à une baisse d'hydratation ainsi qu'à une déminéralisation de la micelle. Ces modifications entraînent la formation de nouvelles liaisons qui se traduisent par la contraction du gel et une meilleure perméabilité, ce qui amplifie l'expulsion du lactosérum.

1.6 Salage

L'incorporation du chlorure de sodium dans le fromage a pour objectifs :

- d'assurer un complément d'égouttage ;
- de contribuer éventuellement à la formation de la croûte ;
- de régler l'activité de l'eau du fromage qui oriente et freine les développements microbiens et les actions enzymatiques au cours de l'affinage ;
- d'accroître le potentiel organoleptique du fromage. (**Eck et al., 2006 ; Jeantet. R ,2012 ; Masoud et al., 2003**)

1.7 Maturation des fromages

La maturation des fromages correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé. Les enzymes intervenant dans cette maturation ont plusieurs origines. Elles peuvent être présentes à l'origine dans le lait (plasmine, lipase, etc.), ajoutées au lait (enzymes coagulantes, micro-organismes), ou produites au cours de la maturation par synthèses microbiennes (bactéries, levures, moisissures).

La maturation des fromages est dominée par trois grands phénomènes biochimiques : la fermentation du lactose, l'hydrolyse de la matière grasse et la dégradation des protéines. Les transformations confèrent à la pâte fromagère des caractères nouveaux. Elles la modifient dans son aspect, dans sa composition, dans sa consistance. Simultanément, saveur, arôme et texture se développent (**Profession fromager, 2014**).

1.7.1 Les agents de la maturation des fromages

Les enzymes responsables de la maturation des fromages ont plusieurs origines (le lait, l'agent coagulant et les micro-organismes qui peuplent les pâtes) :

1.7.1.1 Enzymes du lait :

- plasmine : protéase thermorésistante, elle intervient dans les fromages à pâte pressée cuite et non cuite à affinage lent ;
- phosphatase alcaline : détruite par la pasteurisation, elle aurait un rôle négligeable dans les fromages issus de lait pasteurisé ;
- lipase : enzyme thermolabile, elle intervient éventuellement dans les fromages au lait cru. Elle hydrolyse préférentiellement les acides gras à courte chaîne. Son action est plus marquée dans les laits de brebis et de chèvre car les globules gras sont plus petits que ceux du lait de vache et conduit à des fromages plus typés ;

1.7.1.2 Présure :

Agent coagulant ajouté au lait, elle a une activité de protéolyse générale. Son activité est dominante dans les fromages à pâte pressée non cuite. Les produits formés sont principalement des peptides de poids moléculaire élevé ;

1.7.1.3 Enzymes d'origine microbienne :

La microflore des fromages est composée d'un grand nombre de micro-organismes de différentes origines (lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, levains, etc.) et appartiennent à des groupes et à des espèces très divers.

Les micro-organismes élaborent des enzymes qui agissent sur le substrat. Certaines de ces enzymes sont libérées au cours de la croissance (enzymes exocellulaires) ; d'autres le sont après la mort et l'autolyse des cellules (enzymes endocellulaires). Parmi la flore microbienne, on peut définir 5 grands groupes : les bactéries lactiques, les microcoques, les bactéries corynéformes, les bactéries propioniques, les levures et les moisissures.

Cette microflore est en évolution constante ; certains germes se multiplient, d'autres disparaissent ; l'équilibre microbien n'est pas stable et on assiste à une succession de flores.

1.7.1.3.1 Bactéries lactiques

Ces bactéries sont apportées par les levains. On peut distinguer:

- les lactocoques homofermentaires (*Lactococcus*) : ils constituent la flore dominante dans la plupart des fromages. Il s'agit d'espèces mésophiles dans les pâtes molles et pâtes pressées non cuites, dont la fonction principale est de transformer le lactose en acide lactique et de produire des enzymes protéolytiques intervenant dans l'affinage de la pâte ;
- les lactobacilles et streptocoques thermophiles : ils ont un rôle acidifiant et protéolytique dans la fabrication des pâtes cuites ;
- les *Leuconostocs* hétérofermentaires : ils produisent de l'acide lactique, et sont souvent associés aux lactocoques dans la production de composants aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) et de gaz carbonique. Ils participent ainsi à l'ouverture précoce des pâtes persillées (Bonaiti et al., 2004; Irlinger et al., 2009; Leclercq-Perlat et al., 2004).

1.7.1.3.2 Bactéries propioniques (*Propionibacterium*)

Les bactéries propioniques sont de germes anaérobies, fermentant les lactates en acide propionique, acide acétique et gaz carbonique. Ces germes sont responsables de l'ouverture des pâtes cuites et contribuent à la formation de la saveur et de l'arôme. L'amélioration de la qualité bactériologique des laits, le traitement thermique 76°C/16 s et la dégermination centrifuge ont pour effet de réduire la population propionique originelle des laits. Aussi, il est nécessaire de faire un ensemencement du lait de fabrication avec un levain pour obtenir une ouverture suffisante et un profil fermentaire normal.

1.7.1.3.3 Microcoques et bactéries corynéformes

Ces bactéries de surfaces sont aérobies et halophiles ; elles sont dotées d'activités protéolytiques et lipolytiques et ont une certaine aptitude à la dégradation des acides aminés. On les rencontre à la surface de divers types de pâtes telles que les pâtes molles à croûte fleuris ou croûte lavée, pâtes pressées à croûte emmorgée. *Brevibacterium linens*, caractéristique par sa couleur orangé due à des pigments caroténoïdes, est l'espèce la plus fréquente et répandue des corynéformes.

1.7.1.3.4 Levures

Ces micro-organismes s'adaptent à des substrats variés (air, sol, plantes, eau, ensilage, lait, etc.). On remarque que l'appartenance de *Geotrichum candidum* au sein du groupe des levures est maintenant admise.

On les rencontre surtout à la surface des fromages et ils jouent des rôles variés : désacidification des pâtes par consommation d'acide lactique, formation d'éthanol et de produits secondaires par fermentation du lactose, estérification, actions protéolytiques et lipolytiques. Comme dans le cas des ferments propioniques, ils peuvent être introduits directement dans le lait.

1.7.3.1.5 Moisissures

Elles sont représentées principalement par les deux espèces du genre *Penicillium* apportés par les levains fongiques :

- *Penicillium camemberti* : moisissure superficielle des pâtes molles de type camembert, elle assure la désacidification de la pâte (consommation de l'acide lactique et dégradation des protéines), l'hydrolyse des triglycérides et l'oxydation des acides gras
- *Penicillium roqueforti* : moisissure interne des pâtes persillées, elle est également dotée d'activités protéolytiques et lipolytiques ainsi que de l'aptitude à la dégradation oxydative des acides gras.

Tableau 2 : Principaux groupes microbiens intervenant au cours de l'affinage du camembert d'après Gori.K et Jespersen.L (2010)

Groupes microbiens		Origines	Fonctions
Bactéries			
Streptocoques Lactococcus Streptococcus	lactiques :	Lait et éventuellement levain lactique	Acidification-protéolyse Protection acide
Lactobacilles		Lait et éventuellement levain lactique	Acidification-protéolyse
Leuconostoc		Lait et éventuellement levain lactique	Fermentation du citrate et production du CO2
Pédiocoques		Lait et éventuellement levain lactique	Fermentation-production de composants d'arôme
Entérocoques		Lait	Protéolyse-consistance-goût-odeur
Bactéries Corynebacterium Brevibacterium	Coryneformes :	Lait et éventuellement levain lactique	Protéolyse, dégradation des acides aminés, coloration de la croûte
Microcoques		Lait, saumure, sel	Protéolyse, dégradation des acides aminés
Levures : Debaromyces	Kluyveromyces, Saccharomyces	Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, éventuellement levain	Production de composants d'arôme
Moisissures : camemberti	Penicillium	Levain fongique	Protéolyse, lipolyse, production des composants d'arôme
Geotrichum candidum		Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, levain éventuellement	Désacidification, protéolyse, lipolyse, production des composants d'arôme

1.8 Le fromage à pâte molle type camembert

1.8.1 Définition

Le Camembert est un fromage à pâte molle, affiné en surface, principalement par des moisissures, conformément à la **Norme générale pour le fromage (CODEX STAN283-1978)**, qui se présente sous la forme d'un cylindre plat ou de morceaux dit cylindre. La pâte a une couleur allant du blanc cassé au jaune pâle et une texture molle (lorsqu'on appuie dessus avec le pouce) mais non friable, affinée de la surface au centre du fromage.

Les trous de gaz sont généralement absents, mais la présence de quelques ouvertures et fissures est acceptable. Une croûte molle, entièrement recouverte des moisissures blanches. Le fromage entier peut être coupé ou formé en morceaux avant ou après le développement des moisissures.

1.8.2 Les étapes clés de la fabrication du Camembert :

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

La phase d'ensemencement – maturation :

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

Le lait (un petit volume) estensemencé par des ferments lactiques mésophiles à une dose de 1,5 à 2% (**Laithier C., 2011**). Un temps de maturation suffisant est laissé dans le but de permettre la multiplication et le développement des souches de bactéries lactiques inoculées (**Larpent J.P., 1997**). Une fois ses souches revivifiées, le levain (tel que préparé) servira à ensemenecer les grandes cuves de coagulation.

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

La coagulation :

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

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

Dans le cas de la coagulation acide (provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne), l'abaissement du pH induit la solubilisation du calcium et du phosphate inorganique. Par équilibre, le pont salin dégarni peu à peu les micelles. Ces dernières, vont se lier entre-elles et former un gel cassant, très friable et peu élastique (**Hardy J., 2004**).

La coagulation enzymatique est quant à elle due à l'action de la présure qui est une enzyme protéolytique provenant de caillottes de veaux non sevrés. Cette enzyme correspond en réalité à deux fractions actives : l'une majeure (80 %), constituée par la chymosine, l'autre mineure (20 %), est représentée par la pepsine (**Eck et al., 2006**).

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

Tableau 3 : Les quatre grandes étapes de la fabrication du fromage Camembert lactique fait de lait pasteurisé et les paramètres technologiques généraux associés à chacune d'elles. (Eck et al., 2006)

Etape :	Tranchage-égouttage-synérèse	Salage	Affinage-conditionnement
Ajout du ferment lactique	Décaillage du caillé ferme	Immersion en saumure saturée à 10 °C à 15°C maxi	Mise en hâloir pendant environ 9 jours à 10-14 °C.
Ajout du CaCl ₂ (50ml pour 1000 litres de lait)	Brassage délicat après 15 min, puis intermittent jusqu'au moulage	Temps : 30 min, selon la taille des pièces de fromages	Humidité relative 90- et 95 %.
Maturation : 30 min	Mise en moule de grains fermes		Emballage et mise en chambre froide à 4-6 °C
Ajout de la présure 18 ml/100 kg de lait	Retournements périodiques (0,5, puis 2 et 3 h)		
Temps de coagulation : 35 à 60 min	Baisse régulière de la température		

L'égouttage :

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

Selon **Beuvier (2004)**, il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires :

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

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

2. Affinage des fromages :

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

Selon **Desmazeaud et Cogan (1996)**, L'affinage est en fait la résultante de trois principales actions biochimiques qui se déroulent simultanément à savoir :

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

La finalité de l'affinage est de diriger ces évolutions dans le sens souhaité ; il correspond principalement à des modifications de deux composants majeurs : protéines et matière grasse ; protéolyse et lipolyse sont donc les phénomènes dominants de l'affinage, elles se traduisent par de profondes modifications de la composition physico-chimique du substrat, et par voie de conséquence, de celles de son aspect, de ses qualités organoleptiques, de sa digestibilité et de sa valeur nutritive.

2.1. Les mécanismes de l'affinage

Les transformations précitées se font par l'intermédiaire d'agents de maturation et principalement par les enzymes et les micro-organismes ; leur activité est fortement dépendante à la fois de facteurs internes au fromage et des facteurs externes.

La biochimie de l'affinage se distingue par une extrême complexité et par son caractère très spécifique pour chaque type de fromage. Cette complexité résulte de la grande diversité des agents de l'affinage, de celle des constituants intéressés par les transformations et de l'existence de nombreuses interactions entre les phénomènes responsables (**Champagne et al., 2003**).

De ce fait, la connaissance complète de l'affinage est encore incomplète, mais elle est meilleure pour les fromages produits et consommés massivement que pour les productions mineures à diffusion restreinte. Ainsi, pour les grands types de produits, l'évolution chimique des principaux constituants en cours de maturation a été caractérisée et des corrélations étroites ont été établies entre des profils de composition et la qualité organoleptique.

2.2. Enzymes intervenant dans l'affinage

Les enzymes sont les agents principaux de la transformation des constituants du lait pendant l'affinage. Leur diversité est grande, tant dans leur origine que dans leur nature (**Cogan T.M. et Hill C, 1993**).

Les principales sources d'enzymes sont les suivantes :

2.2.1. Enzymes naturelles du lait

Numériquement peu nombreuses et quantitativement peu importantes, leur rôle apparaît mineur, quoique encore imparfaitement connu.

2.2.2. Enzymes d'origine microbienne

Selon **Desmazeaud et De Roissard (1992)**, ce sont les agents d'affinage prédominants par leur nombre et leur diversité ; ils sont produits à la fois par les micro-organismes pouvant contaminer fortuitement le lait et le fromage lors de la collecte et de la transformation, et par les microflore inoculées volontairement dans le lait et sur le fromage au début de l'affinage (bactéries lactiques et non lactiques, moisissures). Le rôle de ces enzymes étroitement tributaires des traitements technologiques et des facteurs de milieu conditionne à la fois la croissance des micro-organismes, la production des enzymes par ces germes et l'activité enzymatique proprement dite.

Il y a lieu en particulier de souligner l'incidence majeure du traitement thermique du lait sur la destruction sélective des micro-organismes et des enzymes. Pour les produits faits à partir de lait cru, l'importance et la variété des enzymes présentes contribuent à la formation des fromages à composantes organoleptiques très typées. Pour les produits élaborés à partir de lait thermisé et pasteurisé, la faible part d'enzymes résiduelles se traduit par un profil organoleptique plus neutre induit par les floresensemencées de façon dirigée. En ce sens, il y a lieu de rappeler le rôle des bactéries lactiques qui ne se limite pas à leur pouvoir acidifiant ; par leur action protéolytique, longtemps sous-estimée, elles interviennent de façon notable dans le développement des qualités organoleptiques des fromages et plus particulièrement de ceux affinés sans l'intervention d'une flore de surface. (**Leclercq-Perlat et al.,2006 ;Monnet et al.,2015 ;Montel et al.,2014**)

Il convient de remarquer, par ailleurs, le rôle majeur dans l'affinage des moisissures dont l'activité protéolytique et lipolytique est considérablement plus élevée que celle des bactéries et des levures. Ce rôle prépondérant est illustré par de nombreux exemples de fromages - pâtes molles fleuries, pâtes persillées - dont l'affinage est étroitement tributaire du développement équilibré des flores fongiques caractéristiques (**Savijokie et al.,2006**).

Enfin, il faut mentionner l'intervention particulière de bactéries propioniques dans l'affinage de plusieurs types de fromages à pâtes pressées et dures. Cette fermentation donne lieu à une production de gaz carbonique génératrice de l'ouverture de la pâte, les acides propioniques et acétiques contribuant à la formation de la saveur légèrement piquante.

2.2.3. Enzymes d'origine exogène

Les protéases utilisées pour la coagulation du lait contribuent, elles aussi, de manière efficace à l'affinage. Elles ne sont pas totalement éliminées avec le lactosérum lors de l'égouttage. Leur rétention dans le fromage varie de manière importante avec la nature de l'enzyme utilisée. Pour la présure, la quantité retenue croît avec la diminution du pH, alors que pour les enzymes d'origine fongique provenant de *Mucor miehei* ou de *Mucor pusillus*, cette quantité est indépendante du pH et se situe à une valeur plus faible. Dans tous les cas, la quantité d'enzymes résiduelles dans le coagulum dépend également de la thermosensibilité particulière de chaque protéase. Pour cette raison, un traitement thermique en cours d'égouttage peut fortement modifier la protéolyse due aux enzymes coagulantes résiduelles (**Sousa et al., 2001 et Guiraud J.P., 2003**).

Diverses expérimentations ont été également réalisées en vue d'accélérer l'affinage ou de développer des composantes organoleptiques spécifiques, en particulier par incorporation dans le lait ou après égouttage de lipases et de protéases. Les résultats obtenus sont encourageants, mais le dosage et la maîtrise de l'activité enzymatique restent délicats. De plus l'addition d'un nombre limité d'enzymes n'est pas toujours suffisante pour typer les produits. Aussi une autre approche consiste à introduire dans le lait des cultures microbiennes à activité enzymatique multiple, mais dont la vitalité est modulée par des traitements thermiques sélectifs adéquats.

2.3. Les transformations du substrat pendant l'affinage

Pendant l'affinage, les constituants du fromage sont dégradés en composants plus simples à poids moléculaire réduit ; cette évolution est caractérisée par une très grande complexité biochimique. Les réactions ne se font pas isolément, mais sont intégrées au sein de séquences où la molécule initiale est d'abord transformée en produit primaire, puis en produit secondaire et souvent en résidu tertiaire. La cinétique de toutes ces réactions est en outre profondément intégrée à la disponibilité des substrats et à l'influence des facteurs d'environnement : pH - A_w - température, etc (**Desmazeaud et al.,1996 ; Gerrit et al., 2005**).

- Glycolyse

La transformation du lactose en acide lactique précédemment développée pendant la coagulation et l'égouttage se poursuit pendant l'affinage. Le lactose disparaît en général dans les premiers jours de la maturation à la suite de fermentations variées, dues en particulier aux bactéries lactiques et coliformes, aux levures et moisissures ; elles conduisent à une multitude de produits primaires, mais dont l'acide lactique est de loin le plus important. Dans une seconde étape, l'acide lactique peut subir d'autres fermentations en acides organiques plus simples (Ac. propionique, Ac. acétique, Ac. butyrique) qui peuvent eux-mêmes être transformés en composants de la flaveur des fromages comme les aldéhydes et les cétones.

- Lipolyse

La lipolyse se traduit dans une première étape par la libération des acides gras constituant les triglycérides du lait. L'importance du phénomène n'est pas la même pour toutes les catégories de fromages, comme le montre le tableau 4.

Tableau 4 : Teneurs moyennes en acides gras des différentes catégories de fromages (Cholet O., 2006)

Fromages	Pâtes pressées	Pâtes dures	Pâtes molles	Pâtes persillées
Acides gras libres (g/kg)	1,5–3	5–10	20–50	30–60

D'une manière générale, la lipolyse est plus marquée dans les fromages affinés à l'aide de moisissures : le plus souvent, son évolution suit étroitement la croissance du mycelium. Pour les fromages de type Bleu, la lipolyse marquée se poursuit par une transformation secondaire des acides gras en alcools, aldéhydes et cétones, responsables du goût et de l'arôme caractéristiques des produits affinés.

La proportion et la nature des acides gras étant caractéristiques de la composition du lait propre à chaque espèce, les produits de réaction diffèrent et contribuent au typage particulier des fromages affinés, en particulier de ceux fabriqués au lait de chèvre et de brebis.

- Protéolyse

La protéolyse est le phénomène dominant de l'affinage : il se traduit par la libération successive de peptides, puis d'acides aminés; ces derniers peuvent dans certains cas être eux-mêmes dégradés en composants très variés contribuant à la saveur marquée de certains fromages très affinés.

L'importance de la protéolyse et la nature des produits formés n'est pas la même pour tous les types de fromages ; cet état se traduit par un profil de composition particulier en fractions azotées et par un indice de maturation caractéristique, exprimé par le rapport azote soluble à l'azote total (Tableau 5).

Tableau 5 : Valeurs moyennes de l'indice de maturation en fin d'affinage pour les différentes catégories de fromages (Desmazeaud et al., 1979)

Fromages	Pâtes pressées	Pâtes dures	Pâtes molles	Pâtes persillées
Azote soluble % Azote total	15–21	27–32	28–34	30–36

D'une manière générale, les fromages affinés par l'intermédiaire de flores microbiennes (bactéries, moisissures), implantées en surface ou dans la masse, sont plus profondément protéolysés que les fromages qui en sont dépourvus. De plus, la protéolyse étant étroitement tributaire du développement de ces flores, la solubilisation des protéines évolue dans le temps

parallèlement à leur croissance, et est plus marquée au voisinage du lieu d'implantation de ces flores.

2.4 Modalités de l'affinage

La maîtrise de l'affinage est obtenue en fixant différents paramètres propres au substrat et à l'ambiance dans des limites définies. Ces conditions interviennent à un double niveau en agissant sur la prolifération et l'activité des flores microbiennes et sur la production et l'activité des enzymes. Elles constituent des auxiliaires indispensables puisqu'elles permettent de diriger l'activité des agents d'affinage et de faire apparaître les transformations spécifiques souhaitées pour chaque type de fromage.

2.4.1. Rôle du pH

Son rôle est essentiel. Il règle à la fois :

- le développement des micro-organismes constituant les flores internes et superficielles,
- la production d'enzymes par ces micro-organismes,
- l'activité des diverses enzymes contenues dans le substrat, qu'elles soient d'origine microbienne ou apportées par voie exogène.

Les micro-organismes intervenant dans l'affinage provenant d'un ensemencement naturel ou volontaire présentent une sensibilité spécifique au facteur pH. Les bactéries se développent préférentiellement sur les substrats à caractère voisin de la neutralité, alors que les moisissures et les levures ont une plus grande affinité pour les milieux acides. Il faut cependant remarquer que les micro-organismes les plus acidophiles peuvent également proliférer au voisinage de la neutralité. La sensibilité particulière des micro-organismes au facteur pH constitue un élément sélectif primordial de la colonisation du fromage par les souches souhaitées, ainsi que par celles d'origine accidentelle dont le rôle peut être indésirable (**Callon et al., 2004**)

Le pH détermine par ailleurs la production d'enzymes par les microflore ainsi que l'activité de ces enzymes. En général, les protéases présentent une activité maximale à un pH compris entre 5,5 et 6,5. Toutefois, la plupart d'entre elles possèdent une activité encore importante, de part et d'autre de cette zone. Les lipases présentent un caractère basophile plus marqué que les protéases. Leur optimum d'activité se situe généralement entre 6,5 et 7,5, mais, là aussi, on observe de nombreuses exceptions.

Or, au début de l'affinage, l'acidité qui a été développée au cours de la coagulation et de l'égouttage afin de régler à la valeur souhaitée l'humidité et la minéralisation du caillé est souvent excessive pour permettre la prolifération des flores et l'activité enzymatique recherchées. De ce fait, un processus de désacidification doit intervenir, pour optimiser la croissance microbienne et l'activité enzymatique : les modalités sont très différentes selon la catégorie des fromages.

Pour certains fromages à pâte molle et pour les fromages à pâte persillée, la neutralisation de la pâte est obtenue par voie biologique à l'aide de moisissures acidophiles se développant en surface ou dans la masse. Autrefois, l'implantation de ces flores se faisait spontanément en

fonction des caractéristiques écologiques du milieu extérieur et de celles du substrat. Actuellement, le développement des flores est déterminé par un apport de microorganismes sélectionnés, dont l'activité biochimique est connue. Toutes ces flores présentent un caractère aérobie marqué (**Leclercq-Perlat et al., 2004**)

Une seconde catégorie de fromages dits à pâte molle lavée se caractérise par un affinage lié au développement d'une flore bactérienne de surface habituellement connue sous le terme de "ferment du rouge". Cette flore renferme des bactéries variées généralement pigmentées en ocre, dont l'espèce dominante est représentée par *Brevibacterium linens*. En raison de son caractère neutrophile, cette flore ne peut proliférer qu'après une neutralisation préalable de la surface des fromages par des micro-organismes du type levure et *Oidium* implantés spontanément ou de manière dirigée pendant l'égouttage.

Un processus complémentaire de neutralisation intervient par voie chimique grâce au calcium fixé sur les micelles de caséine, et grâce à une diffusion centripète d'ammoniac dans la pâte à partir de l'atmosphère des locaux et par contact direct avec les supports des fromages. La libération d'ammoniac correspond aux produits terminaux de la protéolyse développée, en particulier sous l'influence des enzymes provenant des ferments du rouge.

Dans le cas de la plupart des fromages à pâte pressée et à pâte dure, la désacidification est réalisée par le calcium resté dans le caillé en quantité relativement élevée par suite d'une fermentation lactique limitée au cours de la coagulation et de l'égouttage. Pour certains fromages à pâte pressée, l'affinage est complété par le développement de flores fongiques ou bactériennes de surface participant par voie centripète à la neutralisation de la pâte.

Pour un petit nombre de fromages, le plus souvent de fabrication fermière ou artisanale, la désacidification préalable à la protéolyse est obtenue par voie chimique par apport de cendres de bois riches en potasse à la surface ou dans la masse (**Eck et al., 2006 ; Montel et al., 2012 ; Ramet et al., 2009**).

2.4.2. Rôle de l'activité de l'eau « aw »

En début d'affinage, l' A_w du fromage résulte en partie des modalités de la coagulation et de l'égouttage qui ont conduit à l'élimination plus ou moins importante de l'eau constitutive du lait, mais également de l'état de répartition du sel apporté lors du salage.

Dans la suite de l'affinage, le facteur principal déterminant l' A_w est l'hygrométrie des locaux. Ces deux paramètres sont directement définis par les pressions partielles de vapeur d'eau du produit et de l'ambiance. En pratique l'affinage est toujours réalisé à une hygrométrie inférieure à la saturation. Deux raisons expliquent cette situation. D'une part, il est difficile, dans les conditions pratiques, d'obtenir la saturation de l'air dans une ambiance refroidie car les surfaces réfrigérantes piègent l'eau atmosphérique. D'autre part, une ambiance saturée entraînerait à la surface du fromage une A_w voisine de 1 qui favoriserait la prolifération d'un grand nombre de micro-organismes indésirables ; le rôle sélectif de l' A_w disparaîtrait.

Le choix de l'hygrométrie doit tenir compte de la sensibilité à l' A_w des catégories de micro-organismes dont il convient de favoriser en surface le développement ou au contraire, l'inhibition. D'où une hygrométrie généralement élevée (90 – 95% d'humidité relative) pour

les fromages à flore bactérienne superficielle, une hygrométrie légèrement plus basse (85 – 90 %) pour ceux à flore fongique. Pour les fromages à croûte sèche, l'hygrométrie est ajustée à une valeur faible (80 – 85 %) pour limiter au maximum le développement des flores contaminantes de surface (**Eck et al., 2006 ; St-Gelais et al., 2002**).

L'hygrométrie étant inférieure à 100 % d'humidité relative, il se produit toujours une évaporation de l'eau contenue dans le fromage vers l'ambiance. Cette perte en eau varie fortement d'un type de fromage à un autre en fonction de diverses caractéristiques de celui-ci, à savoir :

- La teneur en eau totale. En général, plus le fromage est humide, plus la perte en eau totale est élevée, toutes conditions étant par ailleurs égales ;
- La surface spécifique du fromage détermine l'importance de la surface d'évaporation. Ainsi, tout fromage dont la forme s'éloigne d'une sphère pour laquelle la surface spécifique est la plus faible perdra une quantité accrue d'eau ;
- L'état de liaison de l'eau. L'eau susceptible de s'évaporer est constituée par l'eau libre, l'eau liée restant fixée dans le produit. C'est donc l' A_w qui définit l'évaporation potentielle dans l'ambiance ;
- L'état de surface des fromages. Il influence fortement l'évaporation. Un fromage à croûte sèche aura un effet barrière vis-à-vis de l'évaporation plus prononcé qu'un fromage de même nature, à croûte humide ;
- Le temps de séjour dans les locaux d'affinage influence également la perte en eau. Celle-ci est accrue lorsque la durée d'affinage est prolongée.

Il convient de noter par ailleurs que les réactions d'ordre biochimique intervenant dans le substrat en cours d'affinage correspondent pour la plupart à des réactions d'hydrolyse qui fixent de l'eau. En conséquence, elles entraînent une diminution de l'eau libre et donc celle de l' A_w (**Lefrileux et al., 2016 ; Upadhyay et al., 2004**).

Considérée globalement, l'activité de l'eau du fromage entier est la résultante d'un ensemble de phénomènes complexes de nature physique (égouttage, évaporation de l'eau, diffusion du sel), chimique (interaction substrat - chlorure de sodium) et biochimique (protéolyse, lipolyse, glycolyse), dont la connaissance encore fragmentaire rend difficile la pleine maîtrise.

Pour plusieurs fromages typiques du bassin Méditerranéen, une méthode traditionnelle d'ajustement de l' A_w à la fois simple et adaptée aux climats chauds consiste à réaliser l'affinage en saumure. Après pressage en vrac, le coagulum égoutté est découpé en portions parallélépipédiques d'un poids de 0,5 – 1,5 kg ; ces portions sont alors immergées en pots ou bidons métalliques contenant une quantité de lactosérum ou d'eau salée comprise entre 10 – 20 % de la masse de fromage. Le taux de chlorure du milieu salé, initialement de 12 à 16 %, correspond à une activité de l'eau de l'ordre 0,90 – 0,94, n'assure qu'une stabilisation partielle vis-à-vis des micro-organismes, et permet un affinage de la pâte pendant la durée de conservation qui est de 6 à 12 mois.

Durant cette phase, un échange se produit entre le fromage et la solution salée selon un processus semblable à celui résultant du salage ; le sel diffuse dans le fromage, ce dernier rejette du lactosérum, l'équilibre est réalisé lorsque le taux de sel avoisine 5 à 9 % ; dans le temps la chute de rendement est rapide à température ambiante; si la conservation est faite à basse température, 0 – 4° C, les échanges sont ralentis et la perte de poids est moindre. L'usage du froid permet par ailleurs de réduire la prolifération de micro-organismes halophiles, en particulier de levures et de moisissures, qui sont parfois générateurs d'accidents de gonflement et de saveurs indésirables.

2.4.3. Rôle de la température

Les micro-organismes intervenant dans l'affinage sont presque exclusivement mésophiles. Les levures et les moisissures possèdent leur optimum de développement à 20 – 25° C. Les bactéries lactiques ont leur optimum à 30 – 35° C, à l'exception des espèces thermophiles pour lesquelles l'optimum de croissance est voisin de 45° C (Al Othaibi et al., 2004 ; Raynaud et al., 2016).

La production d'enzymes par ces micro-organismes est généralement maximale à une température proche de la température de croissance, ou à une valeur légèrement inférieure à celle-ci. Par contre, l'activité optimale de ces enzymes se situe le plus souvent entre 45° et 50° C.

En technologie fromagère, la température des locaux d'affinage est toujours réglée à une valeur très inférieure à celle des températures optimales de croissance des microorganismes et d'activité des enzymes. Cette pratique permet de ralentir l'évolution du substrat et ainsi de la mieux maîtriser notamment en fonction des exigences imposées par la commercialisation.

Dans les conditions habituelles, les températures les plus généralement adoptées sont les suivantes :

Pâtes molles moisies	11 – 13° C
Pâtes molles lavées	10 – 15° C
Pâtes persillées	5 – 10° C
Pâtes pressées non cuites	10 – 14° C
Pâtes pressées cuites	
1ère phase (en cave froide)	10 – 12° C
2ème phase (en cave chaude)	20 – 22° C
Pâtes dures	14 – 18° C

Pour les fabrications de type industriel, on observe une tendance à augmenter les températures dans le but de réduire les durées d'affinage. Toutefois, bien qu'il soit théoriquement possible d'accroître la vitesse de maturation par une température plus élevée, cette pratique reste très

limitée, car elle entraîne des modifications importantes de la qualité organoleptique qui n'entre plus dans les standards auxquels le consommateur est habitué (Montel et al., 2014).

A l'opposé, le froid permet de ralentir globalement les réactions fermentaires et biochimiques modifiant le substrat. Un faible abaissement de température, de l'ordre de la 1 à 2° C est souvent utilisé pour prolonger la durée d'affinage. Une réfrigération à 0 – 4° C assure un ralentissement plus marqué dans l'évolution du substrat sans toutefois arrêter totalement celle-ci. Dans ces conditions, la protéolyse est considérablement ralentie ; par contre, la lipolyse l'est moins.

Lorsqu'il est nécessaire de faire un report prolongé du fromage affiné, de l'ordre de quelques mois, il est possible de recourir à des traitements thermiques sévères comme la congélation et la stérilisation. Ces méthodes restent encore exceptionnelles et ne peuvent convenir indifféremment à tous les types et à toutes les qualités des fromages. Ainsi pour les fromages à pâte molle et à pâte fraîche, la congélation peut se faire à l'état non affiné ; au contraire, une congélation après affinage convient mieux pour des fromages de type pâte pressée.

Il est important de souligner que toute variation non contrôlée de la température chez le fabricant et au cours de la distribution accroît les risques de modification de la cinétique de l'affinage et des qualités organoleptiques du produit.

Il faut aussi considérer que beaucoup de fromages subissant des transformations rapides et importantes par voie fermentaire sont le siège d'un dégagement de calories. Lorsque ces fromages sont confinés dans une enceinte isotherme, l'élévation de température peut provoquer leur dégradation très rapide.

2.4.4. Rôle de la composition de l'air

Pour les fromages affinés à l'aide de micro-organismes, il y a lieu d'adapter la composition de l'atmosphère des locaux à leurs besoins en oxygène.

D'une manière générale, les atmosphères confinées sont à proscrire dans tous les cas d'affinage à l'aide de micro-organismes aérobies stricts. De telles atmosphères rendent difficile la croissance de la flore souhaitée et favorisent le développement de micro-organismes indésirables. De ce fait, un renouvellement d'air par apport d'air neuf est indispensable. Il y a intérêt à filtrer celui-ci pour éviter le risque de contamination des locaux et des fromages (Lefrileux et al., 2016).

Pour certains fromages à pâte molle et à pâte pressée affinés à l'aide de flores bactériennes très protéolytiques de type "rouge", la teneur en ammoniac de l'atmosphère doit être réglée, ce gaz contribue à la neutralisation de la surface des fromages jeunes et favorise le développement des ferments du "rouge". Dans les locaux contenant des fromages affinés, l'ammoniac libéré, comme produit terminal de la protéolyse, est généralement présent en quantité suffisante (Delbès, 2015).

Il est vraisemblable que divers autres composants à l'état gazeux interviennent dans le déroulement de l'affinage, mais aucune relation définie n'a encore été dégagée avec certitude à propos de leur incidence sur la qualité du fromage. De ce fait, ces divers facteurs d'ambiance

sont encore actuellement le plus souvent intégrés de manière empirique par l'affineur qui les module en fonction de la qualité des lots de fromage, de leur évolution et de la charge des locaux.

3. Les flores microbiennes du lait cru au fromage

Les flores microbiennes présentes dans le lait et les produits laitiers sont très complexes. Ces microflore créent entre elles des phénomènes d'antagonisme.

3.1 .Origine des microorganismes

Les microorganismes des aliments ont trois origines possibles :

Ils préexistent dans la matière brute ou l'aliment avant toute manipulation ou transformation.

Ils sont apportés accidentellement lors des manipulations ultérieures de l'aliment.

Ils sont ajoutés volontairement (**Pilet et al., 2005 ; Tortora et al., 2003 ; Verdier-Metz et al., 2009**).

3.2. Préexistence avant transformation de la matière première (Microflores indigènes ou originelles)

Ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, ces micro-organismes dépendent de l'aliment, de la race et d'autres facteurs. Les genres dominants en sont principalement des micro-organismes mésophiles (*Micrococcus sp*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ou *Lactococcus* et les bactéries à Gram négatif).(**Desmaures,1995 ;Labioui et al.,2009 ;Mallet et al.,2012 ;Montel et al.,2003**).

3.3. Apport accidentel lors de la transformation de matière brute

Le matériel utilisé pour les transformations, ainsi que les eaux de lavage ne sont pas stériles. Ils apportent donc des microorganismes et cela d'autant plus qu'ils ne seront pas propres (**Gill, 2006**).

Les insectes comme les mouches, forment aussi des vecteurs très dangereux de microorganismes (**Montel et al., 2003**).

3.4. Addition volontaire

Certains aliments, sontensemencés par des "ferments", le plus souvent des bactéries lactiques (**Beuvier et al., 2004**).

3.5. Les Microflores utiles et leurs rôles

Les microorganismes occupent une place essentielle dans le domaine des produits laitiers et leur importance se situe à trois niveaux : l'élaboration, l'altération et l'hygiène des produits (**Hassan et al., 2001**).

3.5.1 .Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram positif produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples tels que le glucose et le galactose (**Axelsson, 2004**).

Elles se développent généralement dans des conditions anaérobies, voire anaérobies facultatives, et jouent un rôle majeur dans l'acidification du lait et du caillé. Ce sont également des agents de l'affinage des fromages, par leurs aptitudes protéolytiques et lipolytiques (développement du goût, des arômes et de la texture). (**Singleton, 2002**). Ces bactéries lactiques sont principalement constituées de *lactocoques*, *Leuconostoc*, *pédiocoques*, *streptocoques thermophiles*, *lactobacilles mésophiles* et *entérocoques*.

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important de ses aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons. Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Regarded As Safe) (**Tamime, 2002**).

3.5.1.1. Définition

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes (**Labioui et al., 2005**).

Ce sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes (**Bergey's Manuel 1986-1989**), dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides.

Cette transformation génère de une ou deux molécules d'ATP, en fonction de la voie métabolique homo ou hétérolactique (**Carr et al., 2002**)

Voie d'Embden-Meyerhof : homofermentation, dont laquelle l'acide lactique est le principale ou le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat (**Cogan T.M., 1986**).

Voie de Dickens-Horecker : hétérofermentation, conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion comme le CO₂, acide acétique, éthanol.

3.5.1.2. Caractères généraux des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des batonnets (**Larpen, 1997**) elles sont en générale aérotolérantes. Cependant certaines espèces habitant par exemple le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes, même en présence d'O₂, elles sont incapables de réaliser la phosphorylation oxydative. Elles sont Gram-positif; généralement immobiles et asporulées (**Klaenhammert, 2000 et Luquet et al. 2005**).

Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni Cytochrome oxydase. En plus de cela ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (**Madingo et al., 2004**)

Habitat:

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (**Monnet et al.,2008**)et ont été également retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout (**Singleton,2002 et Tailliez,2001**).

3.5.1.3. Taxonomie des bactéries lactiques

La taxonomie des bactéries lactiques a été basée sur la coloration de Gram et il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides (**Dellaglio et al., 1994**).

Les bactéries lactiques regroupent 11 genres dont les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (**Guiraud, 2003**).

3.5.1.3.1 Le genre *streptococcus* :

Ces bactéries sont des cocci sphériques ou ovoïdes regroupées en paires ou en chaînettes, en générale immobiles, à partir des glucides leur métabolisme est homofermentaire, elles produisent un certain nombre d'agents antimicrobiens (**Ouwehand et al., 2004**).

Ces coques Gram+ à exigences nutritives parfois complexes se rencontrent dans des produits alimentaires riches (fromage) .L'appellation « streptocoque » regroupe des genres très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminants et surtout comme agents de fermentation lactique : *lactococcus*, *leuconostoc*, *pediococcus* et *entérocooccus* (**Rulf et al.,2008 ; Zirnstein et al.,2000**).

3.5.1.3.2 Le genre *enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches.

Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (**Tamime , 2002**).

Ce sont des coques Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et présentant une grande diversité phénotypique. Trente-cinq espèces ont été proposées comme faisant partie du genre *Enterococcus*.

La plupart des espèces d'entérocoques sont capables de se développer à pH 9,6 en présence de 6,5% de NaCl, de 40% de sels biliaires, et peuvent survivre 30 minutes à 60°C. Le genre est formé d'espèces dont les contenus en G+C sont voisins (37,5 à 44%).

Par contre, si l'on se réfère aux taux d'hybridation ADN-ADN, elles apparaissent génétiquement différentes les unes des autres et éloignées des autres coques Gram positif, sans activité catalase et anaérobie (**Pritchard et al., 1993**).

Les entérocoques sont présents dans les laits et dans de nombreux fromages traditionnels du bassin méditerranéen. Dans les fromages, les niveaux peuvent s'élever jusqu'à 10⁶ufc.g-1 dans

le caillé et jusqu'à 10^7 ufc.g⁻¹ dans les fromages affinés. Ces niveaux élevés peuvent s'expliquer par la capacité des entérocoques à se développer en milieu acide et à des taux de sels élevés. Les entérocoques joueraient un rôle dans le développement des caractéristiques sensorielles, des fromages. Certaines souches sont d'ailleurs utilisées comme levains lactiques (Montel et al. 2012).

3.5.1.3.3 Le genre *Lactobacillus* :

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques (Ait-Belgnaoui et al., 2005), leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre de coccobacilles aux bacilles fines et allongés (Dubernet et al., 2008). On rencontre des *Lactobacillus* dans la flore intestinale et la flore vaginale (Singleton, 2002).

Selon (Desmazeaud, 1998) Le genre *Lactobacillus* se subdivise en trois groupes:

• **Groupe 1** : *Thermobacterium*

• **Groupe 2** : *Streptobacterium*

• **Groupe 3** : *Betabacterium*

Les lactobacilles sont des bacilles Gram positif, non mobiles, non sporulant, se développant dans des conditions micro aérophiiles à strictement anaérobies. Bien que certains travaux aient révélé la présence d'une catalase chez certaines souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, les lactobacilles ne présentent généralement pas d'activité catalase. Ces bactéries lactiques se divisent en deux groupes homo et hétérofermentaires (Oyetayo et al., 2003).

Parmi les *Lactobacillaceae*, les espèces laitières les plus importantes sont :

Lactobacillus casei, *Lb bulgaricus*, *Lb helveticus*, *Lb plantantarum* (Dubernet et al., 2008).

Ces levains sont ajoutés au lait après la pasteurisation qui a détruit les bactéries présentes éventuellement pathogènes. Ils sont sous forme liquide, coagulés ou lyophilisés. L'importance d'un bon développement des levains lactiques et par leur degré d'acidification lactique conforme sans post-acidification. Les bactériophages constituent l'une des causes les plus importantes de perturbation de cette acidification et de l'égouttage, participation à l'obtention d'affaissement du fromage par une protéolyse accentuée et à l'ouverture des pâtes (Magnusson et al., 2001).

3.5.1.3.4 Le genre *Lactococcus*

Ce sont les streptocoques mésophiles (Alomar, 2007). Ils se présentent sous forme de coques, qu'on trouve isolés, en paires ou en chaînettes de longueur variable (Desmazaud, 1996), ce sont des organismes homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+) (Dellaglio, 1994).

Ce sont des microorganismes mésophiles, à Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chaînettes. Leur métabolisme

est homofermentaire, de l'acide lactique (L+) étant produit par la voie des hexoses (**Samarzija et al., 2001**).

Les lactocoques contribuent ainsi à la protéolyse primaire des fromages. Cette action est mineure, la protéolyse primaire étant principalement réalisée par les enzymes natives du lait ou celles de la présure. D'autre part, l'autolyse précoce des lactocoques permet la libération d'autres enzymes intracellulaires telles que des protéinases, des peptidases, des lipases ou des estérases (**Parente et al., 1994**). Ces mécanismes d'autolyse dépendent des souches de lactocoques. De nombreuses études ont montré l'impact considérable de ces enzymes sur le développement de la texture des fromages pendant l'affinage, participation à la formation du goût (protéolyse, production d'arômes) (**Rijnen et al., 2003**).

3.5.1.3.5 Le genre *leuconostoc*

Les cellules de leuconostoc sont des coques disposées en paires ou en chaînes comme les streptocoques mais cette bactérie est hétérofermentaire produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂, ses espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait, de diacetyl, parfois du citrate, et de dextrans et de levanes en présence de saccharose (**Bekada, 2005**).

Les *Leuconostocs* sont des coques à Gram positif, mésophiles hétéro fermentaires, aérobies à anaérobies facultatifs. Les principaux produits de leur métabolisme des hexoses sont le D-lactate, l'acétate ou l'éthanol, le CO₂ (**Cogan et al., 1997**).

Les *Leuconostocs* sont fréquemment retrouvés dans le lait, les levains, les laits fermentés et les fromages à des niveaux atteignant 10⁸–10⁹ ufc.g-1 de fromage en Crottin de Chavignol par exemple (**Irlinger, 2000**)

Le rôle des *Leuconostocs* dans la formation de l'arôme et la texture des fromages est important : ils sont également soit acidifiants (*L.lactis*) soit aromatisants (*L.cremoris*) (**Gerrit et al., 2005**).

3.5.1.3.6 Le genre *pediococcus*

Les pediocoques sont des bactéries à gram positif, microaérophiles à besoins nutritifs complexe, leur fermentation homolactique donne parfois l'acide lactique racémique, mais fréquemment la forme L prédomine (**Guiraud , 2003**).

Les pédiocoques sont des bactéries lactiques,

- mésophiles,
- à gram positif,
- sans activité catalase,
- non mobiles
- et se présentant sous forme de coques, de 0,5 à 1 µm.

Le contenu du génome en G+C varie de 34 % à 43 %. Elles s'organisent en tétrades.

Les *pediococcus* métabolisent les hexoses en acide lactique (DL) par la voie homofermentaire. Ce caractère peut servir à distinguer les pédiocoques des deux autres genres de bactéries lactiques, les lactocoques et les leuconostocs (**Dworkin, 2006**)

Discrimination entre *lactococci*, *pediococci* et *leuconostocs* à partir de la fermentation du glucose d'après Dworkin, 2006

<i>Lactococcus</i>	—————>	Acide lactique L(+)
<i>Leuconostoc</i>	—————>	acide lactique D(-), CO ₂ , acide, éthanol
<i>Pediococcus</i>	—————>	acide lactique DL

3.5.1.4. Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Si les bactéries lactiques sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnelle, c'est parce qu'elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments (**Luquet, 2005**).

3.5.1.4.1 Les glucides

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes.

Premièrement, le transport du sucre à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire. Deuxièmement, le catabolisme intracellulaire du sucre et enfin la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux généralement acides (**Desmazeaud, 1983**).

Deux types de métabolismes fermentaires sont rencontrés. Un métabolisme aboutit de façon quasi-exclusive à la production d'acide lactique (caractère homofermentaire). L'autre peut produire de l'acide lactique, mais également de l'éthanol et de l'acide acétique suivant les conditions de cultures (caractère hétérofermentaire) (**Ghaly et al.,2005**)

3.5.1.4.2 L'azote

Les bactéries lactiques exigent aussi l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapables, pour la plupart, d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple (**Desmazaud, 1983**).

Elles ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres, ou des peptides courts (peptidases, dipeptidases). Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines

du lait, et notamment les caséines, par des enzymes (les protéases) situées dans la paroi extérieure de la cellule (**Desmazaud, 1998**).

3.5.1.4.3 Les vitamines

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme. Les bactéries lactiques sont, à quelques exceptions près, incapables de synthétiser des vitamines (**Dellaglio et al., 1994**), d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture (**Holzapfel et al., 2001**).

3.5.1.4.4 Les minéraux

La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (**Brennan et al., 2002**).

Du point de vue transport, le fer est un élément important puisqu'il a des affinités pour un grand nombre de molécules chelatrices. Il augmente la croissance et la production d'acide lactique pour les lactocoques et une carence en cet élément donne lieu à une diminution de ce même acide (**Monnet et al., 2008**).

Le potassium, quant à lui, est un cofacteur pour plusieurs enzymes bactériennes et un niveau élevé de K⁺ dans le cytoplasme est requis pour la synthèse protéique. De plus, le système du K apparaît être très important pour contrôler le pH cytoplasmique (**Desmazaud, 1983**).

3.5.1.4.5 L'oxygène

Les bactéries lactiques sont communément appelées micro aérophiles. Ainsi, elles tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs en ce gaz peuvent leur être néfastes. La relation des bactéries lactiques avec l'oxygène a probablement un lien avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit dans la cellule en présence d'air. Il faut éliminer le H₂O₂, car son accumulation devient toxique (**Singleton, 2002**).

3.5.1.5. Rôle des bactéries lactiques

3.5.1.5.1 Rôles technologiques

3.5.1.5.1.1 Production d'arômes

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate :

l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (**Desmazeaud et al., 1992**).

3.5.1.5.1.2 Production d'exopolysaccharides

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini (**Thompson et al., 1994**).

En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yogourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (**Desmazaud, 1983**).

3.5.1.5.1.3 Rôle dans la bio-protection

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentielle dans la bio-protection des produits alimentaires (**Dortu et al., 2009**), elles sont capables de produire une variété de produits inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi sur la flore indésirable ou pathogène (**Desmazaud et al., 1992**).

3.5.1.5.1.4 Les bactéries lactiques et leur action probiotique

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie » (**Helinck et al., 2004**). Un probiotique est un microorganisme vivant qui est lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante il exerce un effet positif sur la santé (**Callon et al., 2004 et Cholet, 2006**).

Les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques (**Irlinger et al., 2015**). Parmi ces effets on peut citer :

- Les bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur le développement et la synthèse de toxines par autres microorganismes pathogènes (**Lindgren et al., 1990**) ;
- Les bactéries lactiques possèdent des propriétés antitumorales qui pourraient être due à :

L'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastro-intestinal. La réduction des activités enzymatiques des bactéries intestinales telle que la β .glucoronidase, l'azoréductase et la nitroréductase (**Dortu et al., 2009**).

· La prévention et traitement des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales (**Alomar, 2007**) ;

· Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de déconjuguer les sels biliaries : les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries que les formes conjuguées ;

· Certaines souches de probiotiques notamment les *lactobacilli* excrètent la β .galactosidase souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilitent la digestion du lactose, elles stimuleraient l'activité enzymatique des microorganismes endogènes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments. Elles stimuleraient également les activités lactase et invertase des cellules épithéliales du tractus digestif (**Larpent, 1997**) ;

· La diminution de la cholestérolémie par réduction de l'absorption intestinale du cholestérol endogène et exogène et la diminution de sa synthèse dans le foie.

3.5.2. Les microflores d'affinage ou microflores de surface

Les principaux microorganismes jouant un rôle connu dans l'affinage sont les bactéries lactiques, les bactéries propioniques, les levures, les moisissures. Les staphylocoques non pathogènes et les bactéries corynéformes aérobies. (Mounier et al., 2007). Les bactéries propioniques sont des bactéries Gram +, fermentant les lactates pour donner de l'acide acétique et propionique, ainsi que du CO₂ (fermentation propionique) (Jany et al., 2008). Ils participent à la formation du goût et de l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite (Montel et al., 2012).

Parmi les bactéries dominantes à la surface des fromages, on retrouve les bactéries à Gram positif, majoritairement, les groupes des staphylocoques et des corynebactéries. Leur importance relative dépend du type de fromages.

Les microflores de surface ont deux fonctions principales dans l'affinage :

Elles produisent des enzymes. Les lipases et les protéinases hydrolysent les matières grasses et les protéines. Les peptidases hydrolysent les petits peptides et les acides aminés, elles désacidifient la surface des fromages. Ce sont principalement les levures et les moisissures qui ont cette fonction. En oxydant le lactate, du CO₂ est émis, celui-ci va contribuer à l'augmentation du pH qui passe de 4,8 à 5,8 voir plus (Pilet et al., 2005).

Les levures *Kluyveromyces*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Yarrowia* sont retrouvées de manière plus importante (en moyenne 100 fois plus) à la surface des fromages (à pâte molle notamment) qu'à l'intérieur. Elles interviennent dans la désacidification de la pâte en début d'affinage, permettant ainsi l'implantation ultérieure d'une flore acido-sensible comme les bactéries coryneformes, et interviennent également dans la formation du goût (Mounier et al., 2007 ; Bonaiti et al., 2004 ; Leclercq-Perlat et al., 2006). Les moisissures ont un rôle très actif dans l'affinage de certains fromages comme les pâtes persillées et les pâtes molles, il existe deux types : (Irlinger et al., 2015).

Moisissures superficielles : elles sont responsables du feutrage blanc des camemberts, du brie...

Moisissures internes : elles sont responsables des veines bleues du fromage persillé et des moisissures internes des autres fromages (*penicillium roquerforti*, *p.camemberti*)

(Irlinger et al., 2015).

3.5.2.1. Les bactéries d'affinage halotolérantes :

3.5.2.1.1 *Micrococcus* est un genre de bactéries à coloration Gram positive appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, décrit pour la première fois en 1872 par Cohn.

Les cellules sont des coques de 0,5 à 2 µm de diamètre, souvent groupées en tétrades ou en amas irréguliers, généralement immobiles. Ce sont des bactéries aérobies, à métabolisme oxydatif, possédant une catalase, chimio-organotrophe.

La paroi cellulaire de *Micrococcus* est importante et peut faire jusqu'à 50 % de la masse cellulaire. Son génome est riche en guanine et cytosine (GC), ayant habituellement un taux de GC compris entre 65 et 75 mol% (Irlinger et al., 2009)

Ces bactéries ont de nombreux habitats, notamment le sol, les eaux douces, les aliments mais leur habitat primaire est la peau des mammifères

Les caractéristiques phénotypique et biochimique des microcoques et des staphylocoques sont très proches. Les plus grandes différences, permettant la différenciation des genres se retrouve au niveau de la séquence ADN, de la composition de la paroi, des acides gras présents sur la membrane et de la classe de ménaquinones (MK) produites. Cependant, ces caractéristiques ne peuvent être facilement mises en exergue dans un laboratoire classique (**Laithier ,2011 ; Vandamme et al., 1996**).

Il faut donc des tests spécifiques, simples et facilement mis en œuvre afin de pouvoir les séparer avec certitude. Voici quelques-uns de ces tests :

- Production d'acide par fermentation (anaérobie) à partir du glucose
- Production d'acides en culture aérobie à partir de glycérol Croissance sur gélose au nitrofurane (gélose FTO)
- Croissance sur gélose au furazolidone (gélose FP).
- Sensibilité au composé vibriostatique (0,5 mg/disque) - Préférentiellement testé sur milieu Mueller-Hinton
- Sensibilité à la bacitracine
- Sensibilité à la lysostaphine

1. Caractères physiologiques qui expliquent leur aptitude à s'implanter à la surface des fromages

- La croissance optimale se situe dans les conditions suivantes
 - d'aérobie stricte
 - en milieu salin (10% NaCl)
 - en zone de pH proche de la neutralité (6 à 8)
 - à une température comprise entre 15 et 37°c

2. Exigences nutritionnelles

- Les besoins sont très variables d'une espèce à l'autre
- Les besoins en acides aminés spécifiques sont faibles : seules quelques souches montrent un besoin relatif en cystéine, méthionine et tyrosine.
- Sur le plan vitaminique, 20 à 40 % des souches *M. luteus* requièrent la présence de thiamine, niacine et acide pantothénique.
- Le D-fructose semble être la source de carbone la plus efficace, mais glycérol, mannitol, glucose et acétate permettent également une bonne croissance.

3. Quelques activités biochimiques en rapport avec leur rôle en technologie laitière

- ces bactéries produisent des endopeptidases exocellulaires, ce sont des métalloprotéases actives dans les fromages.
- ces bactéries produisent des endopeptidases endocellulaires actives sur la caséine du lait. Ces dernières sont alors hydrolysées.
- ces bactéries produisent des lipases qui n'interviennent pas dans l'hydrolyse de la matière grasse des fromages.

- Les micrococci peuvent produire de l'ammoniac par désamination oxydative ou réductrice.

3.5.2.1.2. *Brevibacterium*, ou « ferment du rouge », est une bactérie qui appartient au groupe des corynéformes, acido-sensible, utilisée pour la fabrication des fromages (Irlinger et al., 2015 et Laithier, 2011).

1. Caractères physiologiques qui expliquent leur aptitude à s'implanter à la surface des fromages

- La croissance optimale se situe dans les conditions suivantes:
 - à une température comprise entre 15 et 32°C
 - à pH compris entre 5,8 et 7,5
 - 4% de NaCl a un effet bénéfique et tolère jusqu'à 8% de NaCl
 - importance de la présence d'oxygène
 - en aérobie stricte

2. Exigences nutritionnelles

- *Brevibacterium* nécessite l'addition d'hydrolysats de caséine dans le milieu de base et leur croissance est stimulée par l'extrait de levure.
- Certaines souches de *B. linens* ont besoin d'acide panthothénique, acide para-amino-benzoïque pour se développer.
- Le glucose, l'acétate et le glycérol sont de très bonnes sources de carbones pour le *Brevibacterium*.

3. Quelques activités biochimiques en rapport avec leur rôle en technologie laitière:

- Les *B. Linens* se distinguent de *B.casei* par leur pigmentation orange qui donne la couleur caractéristique des fromages.
- Elles se développent en surface et de temps en temps au cœur du fromage. Leur croissance fait suite à l'implantation des levures qui favorisent le développement des *B. linens* grâce à la production des peptides facilement assimilables, de vitamines.
- Elles participent à la remontée de pH dans le fromage par la consommation de l'acide lactique, et en fin d'affinage par la production d'ammoniac liée à la protéolyse.
- L'activité protéolytique « déméthylase » des *B linens* joue un rôle important dans la synthèse des composés soufrés responsables des arômes typiques d'ail, de chou, de croupi, de houblon.

4. Métabolisme des souches bactériennes destinées à la transformation fromagère

4.1. Métabolisme des sucres

Le lactose est présent exclusivement dans le lait et dans les produits laitiers. Son taux est de 45 g/L dans le lait de vache. On sait qu'il est composé de deux molécules: une de glucose et une de galactose. Pour pouvoir être absorbé par le système digestif, il doit être scindé en deux par une enzyme, la lactase (Thompson et al., 1994).

Pour pénétrer dans la cellule, les sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire. Cette membrane, hydrophobe, possède une perméabilité sélective : elle laisse passer les composés apolaires par diffusion mais se révèle imperméable aux composés polaires hydratés. Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphène-pyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres.

Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propionique. Les fermentations lactique sont les plus connues et les plus couramment utilisées par les microorganismes.

La fermentation lactique est une réaction chimique entre des bactéries et du lait et est un mode de production d'énergie. Les ferments se développent au profit du lactose (glucide du lait) et ils provoquent ainsi la formation d'acide lactique qui fait lentement coaguler la caséine (protéine du lait). La fermentation est arrêtée par la mise au réfrigérateur.

La production d'acide lactique provoque une acidification du milieu, qui permet l'élimination d'autres bactéries, éventuellement pathogènes. Elle permet donc la conservation des aliments. Cette transformation est un des plus anciens procédés de conservation des aliments.

En présence de lactase, enzyme sécrétée par les bactéries lactiques (lactase), le lactose est hydrolysé en glucose et galactose selon l'équation suivante :

Hydrolyse

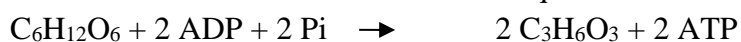


Lactase

Puis le glucose est transformé à son tour en acide lactique selon les équations suivantes

La réaction bilan de la fermentation lactique est :

Fermentation lactique



Glucose

Acide lactique

Cette réaction est favorisée à une température de 45°C. Plus on laisse le lait fermenter longtemps plus le pH diminue, car la quantité d'acide lactique augmente et la solution devient donc plus acide (**Reats et al., 2011**).

Il existe deux voies principales de fermentation lactique:

homofermentation: regroupe la voie de la glycolyse, aussi connue sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof (EM) , suivie de :

La conversion de 2 molécules de pyruvate en 2 molécules de lactate. Au cours de cette voie EM, ces bactéries dégradent le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose ou le lactose.

Elle est surtout utilisée par les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et à certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. Caucasicus* , *Lb. lactis* et *Lb. plantarum* et de *Thermobacterium* comme *Thermobacterium yoghurti*.

hétérofermentation , aussi appelée voie des pentoses phosphate (transcétolases) . (**Reats et al.,2011**) suivi de :

Dégradation des hexoses avec formation d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO₂ et d'une molécule d'éthanol (**Singleton, 2002**).

Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, comme le fructose, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique.

Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol.

Elle est surtout utilisée par les bactéries des espèces appartenant au genre *Lactobacillus* telles que *Lb. brevis*, *Lb. fermenti* et au genre *Leuconostoc*, telles que *Ln. mesenteroides* et *Ln. pentosaceus*.

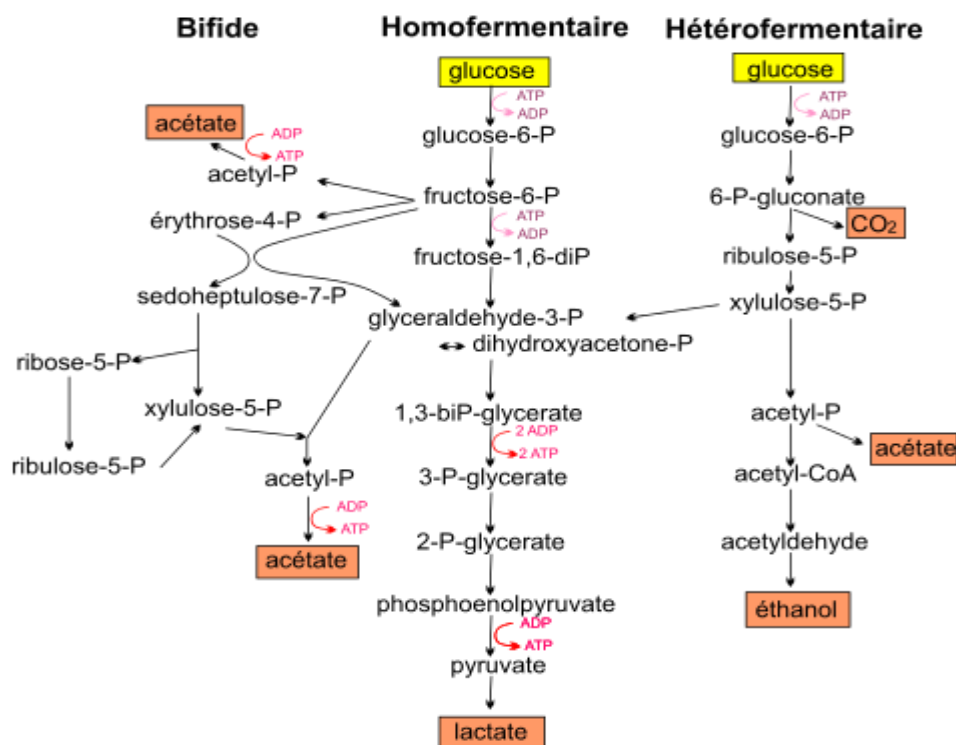


Figure 2 : Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques (Salminen et al., 2004).
A:Homofermentation, B:Hétérofermentation

4.2. Métabolisme des protéines

La dégradation des protéines est due, soit à l'activité protéolytique bactérienne, soit à l'activation des protéases en milieu acide. Les bactéries lactiques provoquent une augmentation des protéines solubles dans le milieu et l'apparition de peptides et d'acides aminés qui outre le fait qu'ils stimulent la croissance des microorganismes, interviennent dans la formation de certains composés aromatiques (Rijnen et al., 2003).

Du fait de leurs nombreuses autotrophies pour les acides aminés et de la pauvreté du lait en acides aminés, la croissance des bactéries lactiques dans ce milieu repose en grande partie sur leurs systèmes protéolytiques. Ce système multi-protéique fait intervenir en premier lieu.

Le catabolisme des protéines représenté par 2 principales étapes de protéolyse:

- une protéase de la paroi suivie des différents systèmes de transport d'acides aminés et de peptides et de dégradation des peptides en acides aminés.

- après une internalisation, ces peptides sont hydrolysés par tout un éventail de peptidases de natures et de spécificités variées conduisant à la libération d'acides aminés alors disponibles

pour les synthèses protéiques la croissance des bactéries, en particulier dans le lait (**Helinck et al., 2004 ; Pritchard et al., 1993 ; Sousa et al., 2001 ;**).

En deuxième lieu; le catabolisme des acides aminés (des activités peptidases et amino-peptidases ont été observées chez *Lb.sakei* , *Lb. Curvatus* et *Lb.plantarum*) (**Ait-Belgnaoui et al., 2005**).

Le catabolisme des acides aminés peut résulter la formation d'autres produits dont les méthyles et les alcools méthyles (**Helinck et al., 2004**). Certains lactobacillus, notamment *Lb. Sakre*, *Lb curvatus* et *Lb. Plantarum* sont dotés des leucine et valine amino-peptidases, contribuant ainsi à la formation de la saveur du produit par les acides aminés et les petits peptides produits (**Beuvier et al., 2004**).

4.3. Métabolisme des lipides

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Hutkins, 2006**).

D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (**Mozzi et al., 2010**).

4.4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Cholet ,20056 ; Gerrit et al., 2005**).

4.5. Rôle dans la conservation

La fermentation lactique est un mode de production d'énergie anaérobie qui déclenche une formation d'acide lactique en présence de glucides et de bactéries spécifiques (les ferments lactiques),

C'est cette production d'acide lactique qui va acidifier l'environnement et contribuer à éliminer les autres bactéries, y compris celles qui pourraient être pathogènes ou contribuer à la dégradation de l'aliment. C'est donc ainsi que les ferments lactiques aident à la conservation des aliments (**Cintas et al., 2001**).

4.6. Production d'acides et diminution de pH

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide (**Corsetti et al., 2001**).

L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules.

4.7. Production de peroxyde d'hydrogène

La production et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène crée un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé. Son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent de peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (**Luquet et Corrieu, 2005**).

4.8. Production des bactériocines

Les bactériocines sont des substances de nature protéique synthétisées par des bactéries et qui ont un pouvoir antibactérien dirigé contre des bactéries taxonomiquement proches du micro-organisme producteur. Ces peptides antibactériens ont une action contre les bactéries à Gram positif associées à l'altération de la qualité hygiénique des aliments et à certaines pathologies humaines.

D'autres agents antimicrobiens sont ainsi produits : dioxyde de carbone (CO₂), l'acide acétique, le diacétyle et l'acétaldéhyde (**Montel et al., 2005**).

4.9. Interactions entre les souches bactériennes :

Lorsque les bactéries lactiques sont utilisées en cultures mixtes pour la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes : l'antagonisme et la stimulation (**Lindgren et al., 1990**).

4.9.1 Phénomènes d'antagonisme :

La fermentation est historiquement utilisée comme un mode de conservation des aliments. Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'auto-inhibition, et/ou des autres souches constituant le levain (**Ouwehand, 2004 ; Stiles, 1996**).

Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices sont connues sous le nom d'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaire et hétérofermentaire des bactéries lactiques (**Ouwehand, 2004**). L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de

dégrader ce composé toxique. L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène peut être renforcée par le système lactoperoxydase-thiocyanate présent naturellement dans le lait.

Les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées lors de la fermentation du lait par une culture mixte (**Guessas et al.,2006 ; Hassan et al.,2001**). Ces chercheurs ont ainsi observé que la croissance d'une souche de lactocoque dans le lait ayant déjà préalablement servi à la pré culture de la souche était inférieure à celle réalisée dans du lait frais. Ce phénomène s'explique par l'épuisement de la fraction azotée de faible poids moléculaire durant la pré culture (**Montel et al., 2014**).

4.9.2 Phénomènes de stimulation :

Les phénomènes de stimulation sont divisés en plusieurs catégories. On distingue le commensalisme, lorsqu'une population est stimulée par la production d'une substance essentielle ou la destruction d'un facteur inhibiteur par une autre population et le mutualisme ou la protocoopération, lorsque l'interaction est positive pour chacune des populations. Dans le cas du mutualisme, l'interaction est nécessaire à la survie des populations contrairement à la protocoopération où l'interaction présente un caractère facultatif.

4.10. Cultures bactériennes mixtes

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres microorganismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en deux catégories : les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (**Monnet et al., 2008 ;Montel et al.,2014**).

4.10.1 Interactions positives

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le commensalisme où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du mutualisme où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique aux deux partenaires (**Cholet, 2006**).

4.10.2 Interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'amensalisme. En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de compétition.

Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats. L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrices, généralement spécifiques (**Cholet, 2006 ; Corsetti et al., 2001 ;Monnet et al., 2008**).

5. Méthodes de caractérisation de l'écosystème microbien des fromages

Des méthodes de caractérisation génotypiques et phénotypiques sont souvent utilisées pour l'identification des différences génétiques ou fonctionnelles entre les organismes, dans le but de faciliter leur comparaison, séparation, mais aussi d'identifier les propriétés technologiques intéressantes.

Les profils microbiologiques et biochimiques, sont les exemples des propriétés phénotypiques examinés chez les bactéries. Puisque des méthodes de caractérisation phénotypiques sont basées sur des produits d'expression de gène, elles peuvent être influencées par les conditions de croissance, la phase de croissance et les mutations spontanées. En revanche, les méthodes de caractérisation génétiques sont basées sur le contenu génétique de la bactérie et de son organisation. Celles-ci visent souvent à identifier les polymorphismes dans les séquences d'ADN mais aussi la présence ou l'absence des séquences d'ADN extra-chromosomique comme les plasmides. Les méthodes de typage génétique sont ainsi moins sujettes à la variation phénotypique, et fournissent une meilleure discrimination et une plus grande reproductibilité que des méthodes phénotypiques classiques.

5.1. Caractérisation de la diversité phénotypique

Chez les bactéries, la différenciation entre les sous-espèces, a longtemps été basée sur des tests phénotypiques, à savoir, la croissance à 4% NaCl, pH 9.2 et à 40°C, mais aussi la capacité de produire de l'ammoniac à partir de l'arginine (**Dellaglio et al.,1994 ; Irlinger,2000**). Cependant, ces tests ne permettaient de sélectionner une souche au niveau sous-espèce. D'une manière générale, la capacité d'acidification, la protéolyse, l'autolyse, le développement d'arômes et la résistance aux phages sont les phénotypes les plus importants lors de la sélection des souches de ferments. En industrie fromagère, le test d'activité de Pearce est le plus utilisé pour l'évaluation de la capacité d'acidification des souches et la vérification de leur réponse thermolytique (**Dellaglio et al.,1994**), puisque le test reproduit le profil de température typique du fromage. Bien que ces méthodes soient utiles pour le criblage initial et la classification des souches, celles-ci sont souvent caractérisées par l'ambiguïté des résultats et la faible discrimination. D'autant plus que la différenciation des souches au niveau de la sous-espèce reste encore difficile à réaliser, d'où la nécessité d'utiliser des techniques plus robustes avec un fort pouvoir de discrimination.

Actuellement, la sélection bactérienne est de plus en plus basée sur les méthodes de typage génétique, et dans certains cas, seule l'analyse des profils génétiques permet de résoudre des problèmes de classification de souches.

5.2. Caractérisation de la diversité génotypique

L'avènement de la biologie moléculaire avec l'apparition de techniques permettant d'extraire l'ADN ou l'ARN bactérien a permis de définir de nouvelles bases pour étudier la diversité génétique et la différenciation des souches. Le grand pouvoir discriminatoire des méthodes génétiques et leur applicabilité universelle, ont désormais rendu possible la différenciation et la distinction de souches bactériennes génétiquement proches (**Rulf et al.,2008**).

5.2.1. L'analyse plasmidique

L'analyse plasmidique est l'une des premières méthodes de biologie moléculaire appliquée pour différencier les souches bactériennes (**Quigley et al.,2011**). Les souches pouvaient être distinguées selon leurs profils plasmidiques mais le désavantage majeur de la méthode était la grande instabilité des plasmides. En l'absence d'une pression sélective sur la souche, celles-ci ont tendance à perdre rapidement leurs plasmides. L'information est souvent incomplète.

Plusieurs approches basées essentiellement sur l'hybridation moléculaire, l'électrophorèse, l'amplification d'ADN et le séquençage ont été développées pour permettre la séparation et la classification des bactéries. À date, plusieurs méthodes de typage moléculaire incluant le RFLP (**Depouilly et al.,2004**), le ribotypage (**Dubernet et al.,2008**), PFGE (**Jany et al.,2008**), RAPD (**Reats et al.,2011**), Rep-PCR (**Irlinger et al.,2015**) ont été appliquées pour l'analyse des genres bactériens.

5.2.2. RFLP

Développée dans les années 70, la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (de l'anglais, Restriction Fragment Length Polymorphism), est basée sur la digestion enzymatique de l'ADN en fragments par des enzymes de restriction. Les fragments sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel obtenu est ensuite analysé par southern blot et révélé avec une ou plusieurs sondes. Cependant, en raison de la complexité des profils et de la variation des tailles exactes des bandes, l'interprétation des résultats RFLP est souvent difficile, et la comparaison des profils devient purement qualitative, d'autant plus, que les sondes permettant de différencier les souches au niveau de la sous-espèce sont inexistantes. Pour faire face à ces variations intrinsèques de la méthode, diverses approches dérivées ont été développées telles que la PFGE et la RAPD.

5.2.3. PFGE

La PFGE est une technique d'électrophorèse en champ pulsé, basée sur l'utilisation d'enzymes de restriction reconnaissant des sites de coupures rares sur l'ADN bactérien, générant un nombre restreint de fragments d'ADN de grande taille. Cette technique a été utilisée pour l'estimation de la taille du génome bactérien et l'analyse de la stabilité des plasmides (**Jany et al.,2008**) et pour l'établissement des cartes chromosomiques des souches (**Mozzi et al.,2010**). Bien que la technique soit applicable à l'analyse intra-espèce, il est parfois difficile d'interpréter les profils observés. De plus, la PFGE ne permet l'analyse que d'un nombre restreint d'échantillons, à cause de sa complexité, son coût élevé et sa durée .

5.2.4. RAPD

La technique RAPD ou random-amplified polymorphic DNA, est basée sur l'amplification aléatoire de l'ADN génomique. C'est une réaction PCR dans laquelle les amorces utilisées vont s'hybrider de façon aléatoire à la séquence spécifique. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil caractéristique de l'ADN de départ

et permettra de différencier entre les souches bactériennes. Chez les bactéries lactiques, la technique RAPD a été utilisée pour la distinction des souches grâce aux différentes empreintes générées pour chaque souche (**Reats et al., 2011**). En 2001, la technique a servi à la séparation de souches isolées à partir de cultures artisanales, grâce à la détection de fragments polymorphiques (**Samarzija et al., 2001**). Cependant, la plus grande limitation de la technique RAPD est le manque de reproductibilité inter-laboratoires, les résultats peuvent varier selon le matériel utilisé, l'opérateur et les amorces arbitraires. Par conséquent, l'interprétation des résultats pourrait être parfois difficile.

Bien que les méthodes de typage moléculaire permettent l'identification et la différenciation des souches bactériennes, leur utilisation pour la définition des relations entre les souches est difficile, les méthodes basées sur les séquences d'ADN sont de valeur à cet égard. En ciblant six ou sept gènes de ménage dans une espèce bactérienne donnée, la technique MLST (Multilocus sequence typing) permet de différencier des souches bactériennes en comparant directement les séquences d'ADN et en identifiant la présence des polymorphismes simples de nucléotides (SNP) dans ces gènes de ménage ciblés. Le principe de base de la technique MLST est basé sur:

- la sélection de gènes de ménage présents chez les espèces bactériennes à analyser,
- l'amplification par PCR et séquençage des gènes sélectionnés pour chacune des souches testées,
- l'alignement des séquences et analyse de similarité
- la détermination des profils alléliques et des séquences types. Contrairement à la MLST, la variante MLSA (Multilocus sequence analysis) est basée sur le séquençage de gènes d'intérêt présentant une plus grande diversité. La technique est simple à réaliser, exigeant seulement la capacité d'amplifier des fragments d'ADN directement par PCR et le séquençage de ces fragments.

Introduite pour la première fois en 1998, la technique a été utilisée pour étudier la relation phylogénique des souches de *L. lactis* d'origines végétales et laitières (**Desmazeaud et al., 1998**). Cette étude a fourni un moyen efficace pour la distinction des sous-espèces bactériennes, mais le schéma MLSA basé sur les séquences partielles de huit gènes (*atpA*, *bcaT*, *pheS*, *pepN*, *pepX* et *rpoA*) n'a pas permis de séparer les souches d'une même sous-espèce.

La meilleure façon pour la distinction et la séparation de celles-ci serait d'utiliser des gènes codant pour des fonctions importantes telles que la protéolyse et l'autolyse.

En résumé, différentes méthodes de typage moléculaire ont prouvé leur efficacité dans l'identification et la différenciation des bactéries lactiques. Parmi ces méthodes, la technique PFGE, semble avoir un fort pouvoir discriminatoire pour la séparation des souches tandis que la technique MLST offre l'avantage de cibler les différences au niveau de la séquence du gène et définit les relations phylogéniques.

Les méthodes de typage moléculaire ciblent, pour la plupart, des régions limitées dans le génome, ce qui implique des limitations au niveau de la caractérisation et l'identification des souches. D'autant plus, qu'aucune information concernant l'identification des gènes variables n'est disponible.

L'avènement du séquençage et l'apport de la génomique ont permis l'émergence d'approches d'analyses globales, appelée approches OMICS permettant une meilleure compréhension de cette diversité génétique entre les souches.

5.3. Séquençage des génomes et annotation

Le séquençage des génomes a beaucoup révolutionné la recherche génétique, biochimique et de biologie moléculaire sur les bactéries lactiques. La souche IL 1403 de *L. lactis* ssp. *lactis* est la première bactérie lactique à avoir le génome entièrement séquencé et publié (**Irlinger, 2000**). Depuis, l'intégralité des séquences génomiques de deux autres souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, d'origine laitière sont désormais publiées, la souche de laboratoire MG1363 (**Wegmann et al., 2007**), dépourvue de plasmides (**Gasson, 1994**) et la souche SKI 1 (**Makarova et al., 2006**), connue pour ses capacités de produire des composés aromatiques et son pouvoir désamérisant. Cette dernière souche est considérée comme une souche industrielle modèle. Une autre souche Q5, désignée comme appartenant à la sous-espèce *cremoris* grâce à la forte homologie de séquence de l'ARNr 16S avec les souches de la même sous espèce, a également fait l'objet d'un séquençage (**Liu et al., 2005**). Récemment, les séquences de deux autres souches non laitières, de *L. lactis* ssp. *lactis* KF147 et KF282 ont été publiées (**Siezen et al., 2010**)

En plus des projets de séquençage de génomes entiers, les séquences de plasmides ont également fait l'objet de plusieurs études (**Boucher et al., 2001**). Les souches de *L. lactis*, sont connues pour contenir une variété de plasmides de tailles allant de 3 à 130 kpb, ces plasmides sont porteurs de gènes qui codent pour des fonctions industrielles importantes, tel que le catabolisme de lactose, l'activité protéolytique, le transport de peptides et d'acides aminés, la production d'exopolysaccharides, la production de bactériocines et la résistance aux phages. Actuellement, nous pouvons compter plusieurs séquences de plasmides dans les banques de données.

La disponibilité et la connaissance des séquences génomiques ont ouvert de nouvelles voies pour une exploration systématique et une meilleure connaissance de la diversité inter- et intra-espèce. En effet, tout ceci a permis l'émergence de deux nouvelles approches "post-génomiques" et leur application dans la recherche chez les lactocoques, la génomique comparative et la génomique fonctionnelle.

5.3.1. Génomique comparative

La génomique comparative est basée sur la comparaison de la structure et fonction des génomes de différentes souches. Elle permet une compréhension plus profonde de l'évolution de la diversité et une estimation de la taille des génomes et de leurs contenus. L'analyse comparative peut se faire moyennant des outils bioinformatiques grâce à la disponibilité des séquences, et également, grâce à des manipulations du matériel génétique, l'ADN des souches à l'étude.

5.3.2. Comparaison bioinformatique

La disponibilité des séquences génomiques des souches de *L. lactis* dans les banques de données a permis de faciliter l'analyse *in silico* de la diversité génomique entre les lactocoques. Une première comparaison a été réalisée entre IL1403 et MG1363 pour comparer les deux sous-espèces (**Irlinger et al., 2015**). Cette analyse a permis de mettre en évidence l'évolution et la plasticité génomique et d'identifier les principales sources de variations et leurs origines. Le diagnostic du séquençage des deux souches de *L. lactis* d'origine végétale KF147 et KF282 et comparaison bioinformatique avec les données des

souches laitières a permis d'identifier pour la première fois chez les lactocoques de gènes impliqués dans le métabolisme de sucres complexes de végétaux (Siezen et al., 2008), ce qui démontre l'adaptation à leur environnement.

De manière générale, ce type d'analyses informatiques conduit à une meilleure évaluation de la diversité génétique, cependant, l'analyse comparative et l'alignement *in silico* ne sont possibles que si les séquences génomiques des souches à étudier sont disponibles. Cette approche ne pourra donc pas être applicable pour la comparaison et l'analyse de la diversité de plusieurs souches de ferments à défaut de disponibilité des séquences. Pour pouvoir effectuer une analyse génomique comparative de souches inconnues; la manipulation de l'ADN des souches et l'utilisation des techniques de génomique comparative *in vitro* sont nécessaires.

Chapitre II - Matériel et méthodes :

1. Méthodologie

1.1. Provenance des échantillons

Les échantillons ont été prélevés dans deux fromageries à caractère industriel, l'une traditionnelle de marque Tessala (Sidi-Belabbès), l'autre de type stabilisée Safilait de (Constantine).

L'échantillonnage a été établi en tenant compte de la périodicité de traite c'est-à-dire selon le stade de lactation qu'elle soit basse, moyenne ou haute.

Les échantillons de fromage à pâte molle de type camembert ont été prélevés aux stades de pré-affinage soit au démoulage (24 h après fabrication), au ressuyage soit 24 heures après salage et à des étapes d'affinage variables à 04 et 10 jours d'affinage. La température se situe entre 11 et 15°C. Le prélèvement des échantillons peut être résumé comme suit :

- Au démoulage
- Après ressuyage soit 24 H après salage
- A 04 jours d'affinage en hâloir
- A 10 jours d'affinage au séchage avant conditionnement

Cette étude a été réalisée d'une part au laboratoire des sciences et techniques de production animales de Hassi-Mamèche (Mostaganem), au laboratoire de la Sarl Hodna-lait M'sila et au laboratoire de recherche en biotechnologie et qualité des aliments INATAA de Constantine

1.2. Diagramme de fabrication pâte molle du camembert industriel :

Jour J :

- Standardisation en matière grasse MG à 25 -26 g/L
- Thermisation à 63°C pendant 20 secondes pour le camembert du Tessala Sidi-Belabbès
- Pasteurisation à 75°C pendant 15 secondes pour le camembert Safilait de Constantine
- Prématuration froide de la totalité du lait : à 10 -15°C pendant 15 à 20 heures avec adjonction de 0,25 g/L de chlorure de calcium (CaCl₂) pour se situer à un pH de 6,35 à 6,40 .

Jour J+1 :

- Maturation du lait à une température de 35 à 36°C pendant 1H30 pour obtenir 6,25 à 6,35 de pH

N.B : la fromagerie Safilait ensemece le lait avec un microbiote exogène lactique thermophile de *Streptococcus thermophilus* à raison de 20 unités pour 1000 litres de lait

- Coagulation du lait :

-Emprésurage avec 19 à 25 ml d'extrait de présure animale (extraite de la caillette de veau au laboratoire INATAA de constantine) pour 100 litres de lait

-Temps de prise : 8 à 12 minutes

-Coagulation totale : 40 à 50 minutes

-Tranchage-synérèse : Durée 30 à 40 minutes

-Les grains de caillé obtenus ont 2 à 2,5 cm de côté, le lactosérum a une acidité qui varie de 13 à 16°D soit un pH de 6,70-6,75.Eventuellement un léger brassage est éventuellement entrepris en cas de difficulté de synérèse, sa réalisation est à 15 minutes après le tranchage

-Moulage, avec 2 à 2,1 litres de lait par moule de 250 gr selon sa richesse en M.A.P intervient après avoir soutiré 30 à 40% du lactosérum. L'acidité de ce dernier se situe à 16-18°D soit un pH de 6,65 à 6,7.

-Egouttage en moule :

-Retournement : Il s'effectue en trois étapes selon l'ordre chronologique

-1^{er} retournement : 30 minutes après moulage

-2^{ème} retournement : 03 heures après moulage

-3^{ème} retournement : 06 heures après moulage

	3H	6H	9H	Démoulage après 15 à 18 heures
Acidité	30°D	60°D	90°D	110 -115 °D
pH	6,25	5,70	5,10	4,9 -4,8

La température de la salle d'égouttage est maintenue à 26-28°C pendant 03 heures après moulage, baisse de 1°C / heure jusqu'à 20°C et 18 -19°C pour la nuit.

Jour J+2 : Pré-affinage

- Démoulage : caillé à pH : 4,7 -4,8 , 40-42% d'E.S.T et 0,35-0,4% de Ca/ E.S.T
- Salage : en saumure pour avoir 1,7 -1,8% de Nacl
- Ressuyage : 15 à 18 heures à 15°C et 85% d'HR
- Pulvérisation avec du *Penicillium candidum (camemberti)*

Jour J+3 :

- Affinage : 9 à 10 jours à 12-13°C et 90-95% d'HR, retournements à J+5 et à J+7

Tableau 6 : Evolution de la composition du camembert en cours d'affinage

Type	Début d'affinage (J+2)		Fin affinage (J+11)	
	MG%	ES%	MG%	ES%
Camembert 40% G/S	16-16,5	40-41	17,5-18	43-44
Camembert 45% G/S	18-18,5	41,5-42,5	20-20,5	44,5-45,5

2. Analyses microbiologiques

2.1- Dénombrement microbien

2.1.1 - Flore totale :

Sur milieu au lactate avec la composition suivante (par litre) : tryptone (10g), extrait de levure (5g), lactate de sodium (5g), chlorure de sodium (30g), gélose (15g) additionné de 5 g /L de carbonate de sodium pour neutraliser une acidification éventuelle .Ce milieu permet de déterminer la culture du nombre maximum de cellules microbiennes présentes (**Leclercq-Perlat et al.,2006 ; Montel et al.,2012**).

2.1.2- Flore lactique :

La recherche de la flore lactique est importante car celle-ci est utile dans l'affinage. Sa quantification permet le suivi de la maturation du fromage, particulièrement de la protéolyse. Cette flore est constituée essentiellement des formes en coques et en bacilles gram+ et catalase (-).

Le principe de ce dénombrement repose sur l'utilisation du milieu spécifique (milieu M17) rendu sélectif par addition d'acide nalidixique. L'incubation aura lieu à 25°C et à 37°C pendant 72 heures (**Brennan et al., 2002 ; Dubernet et al., 2008 ; Montel et al., 2005**).

Le milieu MRS (De Man,Rogosa, et Sharp) a été également utilisé pour l'isolement de la flore lactique. Ce milieu tient compte des caractères acidogènes et acidophiles ainsi que des exigences nutritionnelles de ces germes. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures

2.1.3- Flore halotolérante

Elle est principalement constituée de microcoques et de bactéries corynéformes. Le principe de ce dénombrement repose sur l'utilisation d'un milieu sélectif hypersalé additionné de 20 mg/L d'amphotéricine B (Fungizone) pour empêcher la croissance des levures et des moisissures et de 5g/L de carbonate de calcium. Ce milieu a été retenu par **Mounier et al., (2007)** parce qu'il avait permis d'obtenir une croissance satisfaisante de la flore à Gram positif telle que les bactéries corynéformes et les *Micrococcaceae*, isolés en particulier de la surface et du cœur du camembert. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 heures.

3. Isolement, purification des isolats

L'isolement, la purification et l'identification des souches ont été réalisés grâce à l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'isolement et de purification ont été décrites par **Callon et al., 2004 ; Delbès C.,2015 ; Irlinger F.,2000 ; Jany et al.,2008 et Luquet et al.,2005**. La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu contenant un mélange de 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05% d'extrait de levure et 0.05% de glucose) et de 30% de glycérol et stockés dans des tubes eppendorf à une température de -20°C

Tableau 7. Critères morphologiques d'identification des genres présumés des souches lactiques et halotolérantes

Macro-morphologie	Micro-morphologie	Température °C	Groupes
Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Coccis diplocoques et en chaînettes	37 et 45	Entérocoques et Streptocoques lactiques
Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Coccis diplocoques et en chaînettes	25 à 37	Lactocoques
Colonies transparentes	Coccis ovales en chaînettes	15 à 37	Leuconostocs
Très petites et rondes			
Petites colonies blanches rondes ou lenticulaires	Petits bâtonnets Et en chaînettes	37 à 45	Lactobacilles
Colonie opaque bombée et lisse	Bacille court	10 à 25	Brevibacterium
Colonie arrondie isolée	Coques groupés en Amas irréguliers	10 à 25	Microcoques
A bord régulier bombée lisse et brillante			
Colonie lisse arrondie grisâtre ou blanchâtre	Coccis en tétrades	25 à 37	Pédiocoques

Tableau 8. Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des souches

Micro-organismes	Milieux d'isolement	Température °C	Durée	Incubation
Entérocoques et Streptocoques lactiques	M17 pH = 6,5	37 et 45	72 heures	Aérobiose
Lactocoques	M17 pH = 6,5	30 et 37	72 heures	Aérobiose
Leuconostocs	M17 Hypersalé 6,5% pH = 9,6	30	72 à 96 heures	Aérobiose
Lactobacilles	MRS pH = 6 et pH = 5,5	37 et 45	72 heures	Anaérobiose
Microcoques et brevibacterium	Chapman hypersalé à 5% pH = 7	10 et 25	7 jours	Aérobiose
Pédiocoques	M17 pH = 6,5	30 et 37	72 heures	Aérobiose

4. Détermination de la concentration en cellules viables

La méthode de dénombrement des suspensions fromagères est celle des dilutions successives décrite par **Berodier (2005) et Leclercq-Perlat et al., (2011)**. Les dilutions sont préparées avec des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. La plage de dilution varie de 10^{-2} à 10^{-8} . Les dilutions utilisées dans cette plage varient en fonction de l'avancement de l'affinage et des micro-organismes dénombrés. Pour chaque dilution, trois boîtes de Pétri serontensemencées en surface par 49,2 μ L de suspension. L'ensemencement se fera sur des boîtes de 90 mm de diamètre, au moyen d'un ensemencateur Spiral (Spiral plater, Interscience, France). Cette méthode permettra de dénombrer les colonies sur la totalité de la boîte ou par secteur. La concentration moyenne en cellules viables est établie selon la relation suivante :

$$C \text{ (UFC/g)} = (C_1 + C_2 + C_3) \times D / 3 \times V$$

Où C (UFC/g) est la concentration en Unité Formant Colonie (UFC) par gramme, D est la dilution par rapport au fromage, C_i est le nombre d'UFC pour la boîte i ($C_i = 1$ à 3) et V est le volume de la solutionensemencée (ml)

5. Identification phénotypique des isolats purifiés par les galeries API Biomérieux

On procède à l'identification phénotypique des isolats purifiés par le système API bioMérieux en utilisant les galeries API 50CHL version 5.2 et API 20 STREP pour les bactéries lactiques, API CORYNE et API STAPH pour les bactéries halotolérantes (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante:

- Cultiver la souche pure sur milieu spécifique gélosé 24h à 30°C et à 45°C pour les bactéries lactiques et à 25°C pour les bactéries halotolérantes,
- Ouvrir une ampoule de Suspension API, prélever toutes les colonies de la culture à l'aide d'un écouvillon, et réaliser une suspension dense dans l'ampoule,
- Ouvrir une ampoule de la galerie API et inoculer avec quelques gouttes de la suspension homogénéisée,
- Répartir l'ampoule API ainsi inoculée dans les tubules, et recouvrir avec de l'huile de paraffine stérile,
- Incuber à 25°C, à 30°C et à 45°C en aérobiose pendant 48h.
- Tous les tests sont lus à 24h et 48h (on recherche dans chaque tubule l'acidification produite qui se traduit par le virage de l'indicateur coloré contenu dans le milieu. Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir),
- Enregistrer les résultats obtenus,
- Le profil biochimique ainsi obtenu peut être lu grâce à un logiciel d'identification APILAB (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

N.B : Voir composition des milieux de culture, des réactifs et appareillage utilisé en annexes

6. Identification génotypique des isolats purifiés

L'utilisation de l'identification génotypique par la technique de typage PCR est nécessaire pour déterminer la diversité des souches isolées composant chaque espèce; une appréciation qualitative des populations fortement dépendante de l'étape de la culture (Cholet,2006).

Pour cette étude, nous avons suivi le protocole suivant :

A/ Extraction de l'ADN total :

L'extraction et la purification de l'ADN a été réalisée par le kit oCheck (GREINER BIO-ONE GmbH Allemagne ; voir annexe I) à partir d'une culture de souche jeune de 18 heures réalisée dans 5 ml de bouillon spécifique M17 ou MRS pour la flore lactique et milieu nutritif de Chapman pour la flore halotolérante. (N.B : les colonies utilisées pour la culture doivent être apparentes et bien spécifiques à la souche lactique purifiée issues de cultures d'amorçage par repiquage et incubation avec un facteur temps-température respecté).La détermination de la concentration d'ADN a été obtenue par le dosage au spectrophotomètre Nano drop sample retention system (Thermo Fisher Scientific Inc.) Le principe de cette spectrophotométrie repose sur le fait que les acides nucléiques présentent un maximum d'absorption dans l'U.V déterminant ainsi leur concentration et leur pureté (Quigley et al.,2011) .L'ADN donne un pic d'absorption spécifique à 260 nm. La présence de tout autre pic témoigne de l'existence d'impuretés. La concentration d'ADN a été calculée $[ADN]ng/\mu l = D.O \text{ à } 260 \text{ nm} \times F \times A$

Où F = Facteur de dilution

A = Absorption ADN

L'ADN est libéré par lyse de quelques colonies bactériennes durant une incubation de 30 minutes à 55°C en présence de la protéinase K et d'un tampon de lyse. Pour précipiter l'ADN génomique sur la membrane de la colonne, il est nécessaire d'ajouter l'éthanol au lysat. L'ADN génomique une fois fixé sur la membrane de la colonne, les contaminants sont éliminés par deux solutions de lavage (soit deux tampons W1 et W2). L'élution de l'ADN génomique se fait par ajout de 100 µl de Tampon E (Tris EDTA) préchauffé à 70°C sur la colonne suivie d'une centrifugation à 11000 g pendant 1 minute à 4°C.

B/ PCR (Polymérase Chaîne Reaction)

La PCR est une technique de Biologie moléculaire qui permet d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérases celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce (Irlinger,2000).

Les « acteurs » qui interviennent en PCR sont :

- 1- L'ADN généralement sous forme double-brin contenant le fragment à amplifier
- 2- Deux amorces, sens et anti-sens ; ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire .Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.
- 3- Une enzyme la Taq Polymérase (Taq-Pol), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* .Sa température optimale d'action est de 72°C et est capable de résister à des passages successifs à 95°C ; ce qui rend possible l'automatisation de la procédure
- 4- 04 nucléotides ; dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates) qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.
- 5- Cofacteur métallique activateur MgCl₂ : cofacteur essentiel des ADN polymérases

Le principe de la PCR repose sur la répétition cyclique de trois types de réactions en présence d'amorces, d'une ADN polymérase et d'oligonucléotides. Dans la première réaction un chauffage à 95°C permet de séparer les deux chaînes d'ADN (**Mounier et al.,2007**). Après un refroidissement à 60°C environ la deuxième réaction permet d'associer l'amorce aux chaînes monocaténares complémentaires à l'extrémité 5'. Dans la troisième réaction la présence d'une ADN polymérase permet la synthèse de fragments mères. Les amorces serviront de signaux de départ .Ces réactions sont répétées 30 à 35 fois.

- **Préparation des mélanges réactionnels :**

La réaction de polymérisation en chaîne PCR consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces spécifiques encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500 bp (Tableau 9).Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume total de 25 µl suivant le mélange réactionnel indiqué sur le tableau 10

Tableau 9 : Séquence des amorces utilisées en PCR de la firme Qbiogène Research Service France

Amorce	Séquence	Sens
Pour <i>Lactobacillus acidophilus</i>	5'-GTAAATCTGTTGGTTCCGCT-3'	Sens
	3'-ATGGCTGCTCGCGTCTTTAA-5'	Anti-sens
Pour <i>Lacobacillus delbrueckii</i>	5'-TCAAATGTAAATCATGATGT-3'	Sens
	3'-CGTCCATCTTTAAGACCCAA-5'	Anti-sens
Pour <i>Lactobacillus fermentum</i>	5'-GCGACCAAATCAATCAGG-3'	Sens
	3'-AAGTGTTATGGGCCTAGTCA-5'	Anti-sens
Pour <i>Lactobacillus casei</i>	5'-TGTTGAAATCAAGTGCAAGG-3'	Sens
	3'-CGCACCACTTTTGCTTTAATA-5'	Anti-sens
Pour <i>Enterococcus</i> en général	5'-TGTAGTTTGTCATCAACCAT-3'	Sens
	3'-CCTTATGCGGTAGTCACCTC-5'	Anti-sens
Pour Lactocoques et Streptocoques lactiques	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGTTG-3'	Sens
	3'-TCGCCTCATGTAGGATCCAT-5'	Anti-sens
Pour pédiocoques	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACC-3'	Sens
	3'-GTAATCATGTTGGTTCGCT-5'	Anti-sens
Pour <i>Lactococcus lactis ssp diacetylactis</i>	5'-CTGGTCCTGGTGGAGGTCAA-3'	Sens
	3'-TCATGTTGTAAATCATGGGT-5'	Anti-sens
Pour bactéries halotolérantes en général	5'-CCTCTACCAACTAGAGCTATG-3'	Sens
	3'-ACCGATTACTTGTACGATCGA-5'	Anti-sens
Pour <i>Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris</i>	5'-CCGTTACCCCTAAACCCCGAC-3'	Sens
	3'-CAACTCCTTCAGACCACATGC-5'	Anti-sens

Tableau 10 : Mélange réactionnel de la PCR

Réactifs	Quantités en (μ l) pour un tube
PCR buffer 10x	2,5
dNTP 2 Mm	5
MgCl ₂ (50 mM)	0,75
Taq DNA polymerase 1U/ μ l	0,5
Eau pure stérile	10,25
ADN (0,01 μ g/ μ l)	5
Amorce spécifique Fwd(50 μ M)	0,5
Amorce spécifique Rev (50 μ M)	0,5

Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur Hybaid(Thermo Electron Corporation). Les amplifications sont réalisées selon le programme mentionné dans le tableau 11

Tableau 11 : Programme établi pour l'amplification PCR par le thermocycleur Hybaid

Etapas	T°c	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	95	5 min	1
Dénaturation	94	60s	
Hybridation	60	120s	32
Extension ou élongation	72	180s	
Elongation finale	72	3min	2

-Electrophorèse des produits de la réaction PCR

Les gels d'agarose à 1,5% ont été préparés avec le tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE 1X) par addition de bromure d'Ethidium (BET) à une concentration finale de 4 μ l/100ml. Le gel préparé a été déposé dans une cuve contenant le tampon TBE (Tri Borate EDTA) .Un mélange de 4 μ l composé d'un aliquote de 2 μ l de chaque amplicon avec 2 μ l d'une solution de bleu de migration (Bromophénol avec du saccharose) a été chargé au niveau d'un puit du gel déposé et un voltage constant de 80 volts a été appliqué aux bornes de la cuve pour une migration de 1 heure. Le marqueur de poids moléculaire 100 pb stepladder (Promega, USA) a été utilisé .La révélation des bandes sur le gel a été faite sous ultra -violet ($\lambda=321$ nm) et a été ensuite photographié sur le GBOX, SYNGENE, l'acquisition et l'analyse de l'image est réalisée par le logiciel GenSnap.

C/ Critères d'identification génotypique :

L'identification du genre ou de l'espèce est effectuée selon les critères définis par **Quigley et al.,2011** :

- Si la comparaison de la séquence obtenue avec une séquence d'une espèce de référence classifiée a rapporté des pourcentages de similitude \geq à 99%, l'isolat inconnu sera assigné à cette espèce.
- Si les pourcentages sont entre 97% et 99% l'isolat inconnu sera assigné au genre correspondant.
- Si les pourcentages sont $<$ à 97%, l'isolat inconnu sera assigné à une famille

Tableau 12 : Souches employées pour établir l'arbre phylogénétique en utilisant les séquences de leurs gènes 16S rRNA

Nom de la souche de référence du gène 16SrRNA

Lactobacillus delbrueckii ATCC 11842

Lactobacillus fermentum ATCC 9338

Lactobacillus acidophilus DSM 20079 et ATCC 4356

Lactobacillus casei ATCC 393

Lactococcus lactis ATCC 49032

Enterococcus faecalis ATCC 14506

Enterococcus faecium ATCC 27270

Pediococcus acidilactici ATCC 8042

Brevibacillus brevis ATCC 8246

Micrococcus luteus ATCC 4698

Streptococcus thermophilus ATCC 19258

Micrococcus xylosum ATCC 29971

Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris ATCC 19254

7. Etude de quelques aptitudes technologiques de la flore indigène isolée

7.1. Pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude. On commence par la préparation de lait écrémé à 10% dans des flacons de capacité 250ml. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon seraensemencé par une culture lactique (V/ 100V). Après incubation à 37°C, à un intervalle de temps de 2h, 6h et 24h;10ml du lait sera prélevé puis titrer par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (**Larpent, 1997**).

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

Où :

VNaOH: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

La mesure de pH sera faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH sera déterminé à chaque fois qu'on procèdera au dosage de l'acide lactique.

7.2. Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10% sera coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stérile seront déposés en surface de la gélose. Chaque disque recevra un volume de 20µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la protéolyse se révélera par des zones claires autour des disques (**Veuillemard, 1986**).

7.3. Pouvoir lipolytique

La lipolyse sera mise en évidence sur gélose aux triglycérides. Cette dernière sera coulée et solidifiée. Des disques de papier Wattman stériles seront déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque recevra 10µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant deux jours, la lipolyse sera révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des disques (**Guiraud, 2003**).

7.4. Pouvoir texturant

Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée : Les souches à tester seront ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifestera par l'apparition de colonies larges et gluantes (**Leveau et al., 1993**).

7.5. Pouvoir aromatisant

La capacité des ferments mixtes à produire des composés aromatisants au cours de processus de fermentation peut être mise en évidence sur le milieu PCA-lait (voir annexe I). Pour ce faire, chaque tube contenant du PCA-lait stérile sera ensemencé par un des souches isolées. Après incubation pendant 24h et coagulation du milieu, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII seront ajoutés et laissés reposer. La présence d'arôme sera révélée par l'apparition d'un anneau rouge (**Leveau et Bouix ,1993**).

7.6. Activité antibactérienne

Ce test décrit par **Tadesse et al., (2004)** consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de quatre souches : *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella* ATC14028 et *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

La méthode des disques décrite par **Tadesse et al., (2004)** sera appliquée : elle consiste à inonder en surface le milieu Mueller-Hinton par la souche indicatrice. Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) seront déposés à la surface de la gélose. Chaque disque recevra 10µl d'une culture lactique jeune. Les boîtes seront séchées à température ambiante, et seront incubées à 4°C pendant 4h, et par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduira par la formation de zones claires autour des disques.

8. Essai de fabrication industrielle d'un fromage avec un microbiote contrôlé

Les souches purifiées que nous avons réussi à cultiver, à identifier et à isoler ont été utilisées dans la fabrication d'un fromage industriel à pâte molle type camembert à partir d'un lait épuré, innovation technologique de traitement initiale de la matière première, nécessaire à la maîtrise des populations microbiennes et l'obtention d'un fromage

Le microbiote utilisé pour l'essai technologique a été formulé comme suit sur le tableau 13

Les proportions utilisées ont été définies pour préparer un levain pour un ensemencement d'un lait à raison de 3% normalisé pour les fabrications de type pâte molle (**Eck et al.,2006**).

La qualité de notre levain lactique été définie par sa capacité à produire de l'acide lactique, évaluée par la quantité produite pour une durée et à une température donnée (évaluation établie sur la partie étude des aptitudes technologiques de la flore lactique indigène isolée)

Tableau 13 : Microbiote sélectionné pour l'essai de fabrication industrielle

Composition	Action enzymatique	Effet sur l'affinage	Proportion utilisée %
Lactocoques	Acidification	Protection acide	50%
Lactobacilles et Streptocoques	Acidification-protéolyse	Consistance –goût	30%
Leuconostocs	Fermentation du citrate et production du CO ₂	Goût-tenue du fromage	5%
Entérocoques	Protéolyse	Consistance-goût et odeur	5%
Pédiocoques	Fermentation-Protéolyse	Consistance-goût et odeur du fromage	5%
Microcoques	Protéolyse-lipolyse	Coloration de la croûte –goût et odeur	3%
Brevibactériums	Protéolyse-lipolyse	Coloration de la croûte-goût et odeur	2%

Chapitre III

Résultats et discussions

1. Dénombrement bactérien

Les résultats du dénombrement bactérien montrent une différence notable de la flore lactique et halotolérante entre les deux types de fromages à cause d'une technologie de fabrication différente et du traitement thermique appliqué sur les laits transformés. La flore totale est de l'ordre de $28 \cdot 10^7$ Ufc.g⁻¹ en début d'affinage pour la technologie industrielle traditionnelle et de l'ordre de $12 \cdot 10^7$ Ufc.g⁻¹ pour celle de type stabilisé, alors que la flore halotolérante est de l'ordre de $7 \cdot 10^4$ Ufc.g⁻¹ pour le camembert Tessala contre $1,5 \cdot 10^2$ Ufc.g⁻¹ pour celui de Safilait (Tableaux 14 et 15). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Desmaures, (1995)**.

Le nombre se distingue avec la qualité de l'échantillonnage en relation avec la race animale d'une même exploitation d'élevage et de la transformation fromagère utilisée.

Les dénombrements bactériens effectués sur les 03 périodes de lactation présentent une excellente répétabilité pour les 03 flores étudiées avec une incidence moyenne représentée comme suit :

Pour la technologie industrielle traditionnelle, la flore lactique sur milieu MRS est de l'ordre de $6 \cdot 10^6$ Ufc.g⁻¹ au démoulage contre $5 \cdot 10^2$ Ufc.g⁻¹ en fin d'affinage, celle dénombrée sur M17 est de l'ordre de $14 \cdot 10^6$ Ufc.g⁻¹ au démoulage contre $4 \cdot 10^7$ Ufc.g⁻¹ en fin d'affinage. La flore halotolérante est de l'ordre de $7 \cdot 10^4$ Ufc.g⁻¹ au démoulage contre $4 \cdot 10^5$ Ufc.g⁻¹ en fin d'affinage.

Pour la technologie industrielle de type stabilisée, la flore lactique sur milieu MRS est absente, celle dénombrée sur M17 est de l'ordre de $4 \cdot 10^7$ Ufc.g⁻¹ au démoulage contre $9 \cdot 10^7$ Ufc.g⁻¹ en fin d'affinage. La flore halotolérante est de l'ordre de $1,5 \cdot 10^2$ Ufc.g⁻¹ au démoulage contre $6,5 \cdot 10^4$ Ufc.g⁻¹ en fin d'affinage.

Les niveaux de population atteints sont comparables à ceux qui ont été observés sur des fromages similaires fabriqués à partir du lait de vache thermisé (**Dubernet et al., 2008 ; Desmaures N., 1995 et Leclercq-Perlat et al., 2006**) mais comparablement différents sur ceux fabriqués avec du lait pasteurisé.

Tableau 14. Incidence moyenne des bactéries lactiques isolées dans le fromage industriel de type traditionnel fabriqué avec du lait de vache thermisé à 63°C de la fromagerie Tessala Sidi-Belabbès durant les 03 périodes de lactation (* unité : g/100g)

Type d'analyse	Camembert au Démoulage J+2	Camembert après ressuyage J+3	Camembert au 4 ^{ème} jour d'affinage J+6	Camembert à Fin affinage J+12
1/ Etat physiologique du substrat le fromage				
pH	4,81	4,74	5,34	6,78
NaCl g *	1,95	2,51	2,1	1,55
Humidité %	57,15	51,65	54,95	56,2
Température °C	20	15	12	12
2/ Paramètres de l'enceinte d'affinage				
Température °C	15	12	12	12
HR %	85	95	95	95
Fréquence d'aération en 24 heures	–	1	1	1
3 / Etat microbiologique du substrat				
Flore totale UFC/g	28 10 ⁷	11 10 ⁷	18 10 ⁷	21 10 ⁷
Flore lactique sur MRS UFC/g à pH 6	6 10 ⁶	10 ³	8 10 ³	5 10 ²
Flore lactique sur M17 UFC/g	14 10 ⁶	6 10 ⁶	21 10 ⁶	4 10 ⁷
Flore d'affinage « halotolérante » UFC/g	7 10 ⁴	2 10 ³	18 10 ³	4 10 ⁵
2/ Espèces apparentées				
Brevibacterium	1%	3%	9%	12%
Enterocoques lactiques	27%	17%	13%	5%
Microcoqsues	2%	6%	12%	18%
Lactobacilles	12%	16%	9%	2%
Lactocoques	28%	24%	22%	31%
Leuconostocs	18%	19%	12%	11%
Pédiocoques	12%	15%	23%	21%
Streptocoques lactiques	0%	0%	0%	0%
3/ Isolats	25	14	14	11

Il est à noter également que les Streptocoques lactiques qui proviennent de l'ensemencement pratiqué au lait pasteurisé constituent l'essentiel de la flore lactique dans le fromage de type stabilisé. Leur taux est de l'ordre de 34% au démoulage et diminue en fin d'affinage de presque la moitié. En revanche, certaines espèces bactériennes lactiques tels les lactobacilles et les pediocoques et une espèce halotolérante brevibactérium, non décelées sur le fromage stabilisé, se retrouvent sur le fromage traditionnel. D'une population réduite au début d'affinage, les brevibactériums et les microcoques se développent sensiblement en milieu halophile après le salage, ce sont des agents protéolytiques actifs en affinage. Par ailleurs, la flore lactique et halotolérante représentent respectivement 80% et 20% en début d'affinage alors qu'elles sont de l'ordre de 60% et 40% en fin d'affinage

Tableau 15. Incidence moyenne des bactéries lactiques isolées dans le fromage industriel de type stabilisé fabriqué avec du lait de vache pasteurisé à 72°C de la fromagerie Safilait Constantine durant les 03 périodes de lactation (* unité : g/100g)

Type d'analyse	Camembert au Démoulage J+2	Camembert après ressuyage J+3	Camembert au 4 ^{ème} jour d'affinage J+6	Camembert à Fin affinage J+12
1/ Etat physiologique du substrat le fromage				
pH	5,1	4,86	5,38	7,1
NaCl g *	2,1	2,62	2,04	1,9
Humidité %	55,13	53,4	52,4	53,86
Température °C	20	15	13	13
2/ Paramètres de l'enceinte d'affinage				
Température °C	15	13	13	13
HR %	85	95	95	95
Fréquence d'aération en 24 heures	–	1	1	1
3 / Etat microbiologique du substrat				
Flore totale UFC/g	12 10 ⁷	4 10 ⁷	11 10 ⁷	23 10 ⁷
Flore lactique sur MRS UFC/g à pH 6	Abs	Abs	Abs	Abs
Flore lactique sur M17 UFC/g	4 10 ⁷	15 10 ⁵	14 10 ⁶	9 10 ⁷
Flore d'affinage « halotolérante » UFC/g	1,5 10 ²	18 10 ²	8 10 ³	6,5 10 ⁴
2/ Espèces apparentées				
Brevibacterium	0%	0%	0%	0%
Enterocoques lactiques	17%	18%	21%	19%
Microcoques	9%	13%	22%	32%
Lactobacilles	0%	0%	0%	0%
Lactocoques	28%	22%	15%	14%
Leuconostocs	12%	15%	18%	17%
Pédiocoques	0%	0%	0%	0%
Streptocoques lactiques	34%	32%	24%	18%
3/ Isolats	12	6	11	11

2. Isolement purification des isolats

Sur un total de 356 isolats, 104 souches ont été purifiées et identifiées durant les 03 périodes de lactation et réparties entre Brevibactérium (05 isolats), Entérocoques lactiques (19 isolats), Lactobacilles (11 isolats), Lactocoques (30 isolats), Leuconostocs (13 isolats), Microcoques (11 isolats), Pediocoques (05 isolats), Streptocoques lactiques (10 isolats) (Tableau 16).

Tableau 16 : Nombre d'isolats purifiés par espèce apparentée durant les trois périodes de lactation sur les deux fromages industriels de type traditionnel et stabilisé

Espèces apparentées	Fromage de type traditionnel			Fromage de type stabilisé		
	Nombre d'isolats en basse lactation	Nombre d'isolats en moyenne lactation	Nombre d'isolats en haute lactation	Nombre d'isolats en basse lactation	Nombre d'isolats en moyenne lactation	Nombre d'isolats en haute lactation
Brevibacterium	2	1	2	0	0	0
Enterocoques	4	2	2	3	5	3
Lactobacilles	2	2	7	0	0	0
Lactocoques	6	5	7	4	4	4
Leuconostocs	2	3	4	0	2	2
Microcoques	2	3	3	0	1	2
Pédiocoques	0	0	5	0	0	0
Streptocoques	0	0	0	3	3	4

L'ensemble des souches de bactéries lactiques et halotolérantes ont été isolées des deux types de camembert ; elles ont été cultivées et isolées sur des milieux spécifiques (MRS, M17 et Chapman) et du fait des exigences nutritionnelles, ces milieux ont été enrichis en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (**Dubernet et al., 2008 ; Irlinger, 2000 ; Jany et al., 2008 ; Lortal et al., 2005 ; Montel et al., 2014**). L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques, comme définis sur les tableaux 7 et 8 ont montré une diversité des espèces bactériennes isolées ; ces espèces détectées dépendent essentiellement de la période de lactation, de la technologie de transformation utilisée et de l'étape d'affinage du fromage.

A partir des résultats obtenus pour les trois périodes de basse, moyenne et haute lactation, il s'avère que la dominance des espèces bactériennes varie avec le temps d'affinage. C'est ainsi que 08 espèces ont été identifiées phénotypiquement comme étant les plus répandues et le plus souvent dominantes en début d'affinage réparties par ordre d'importance en Streptocoques lactiques 25%, Lactocoques 22%, Leuconostocs 20%, Lactobacilles 15%, Enterocoques 8%, Pediocoques 5%, Microcoques 3% et Brevibactérium 2%. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Leclercq-Perlat (2011) et Montel et al., (2012)**. C'est ainsi que, rapporté par plusieurs auteurs, la finalité de l'affinage est de diriger le comportement de la flore microbienne dans le sens souhaité (**Brennan et al., 2002 ; Eigel et al., 2001 ; Jeantet, 2012 ; Mahaut et al., 2011**). On constate aussi que la flore originelle a été

fortement touchée par le traitement thermique utilisé dans les deux technologies de transformation ; 08 groupes d'espèces apparentées ont été isolés dans le camembert industriel traditionnel issu d'un lait thermisé à 63°C alors que seulement 02 groupes d'espèces acidifiantes apparentées aux lactocoques et aux streptocoques lactiques avec un groupe d'espèces lactiques commensales d'entérocoques lactiques ont été isolés dans le camembert de type stabilisé issu d'un lait traité à 72°C pour les différentes périodes de lactation.

Les figures 3 et 4 illustrent les évolutions moyennes des deux technologies industrielles de transformation durant les deux phases de lactation où l'on observe que la flore acidifiante, représentée par les Lactobacilles et les Streptocoques majoritaires au début d'affinage, régresse en fin d'affinage pour permettre à la flore halotolérante naturelle apportée par le lait (tels que les Microcoques, les Brevibactériums) de prendre la relève. Cependant, seuls les Lactocoques, les Entérocoques et les Leuconostocs subsistent à un niveau supérieur par rapport aux autres espèces qui tendent à disparaître. Ces résultats concordent avec ceux de **Callon et al.,2004 ; Laithier, 2011 ; Corsetti et al.,2001 ; Ghaly et al.,2005 ; Irlinger et al.,2000 ; Montel et al.,2014.**

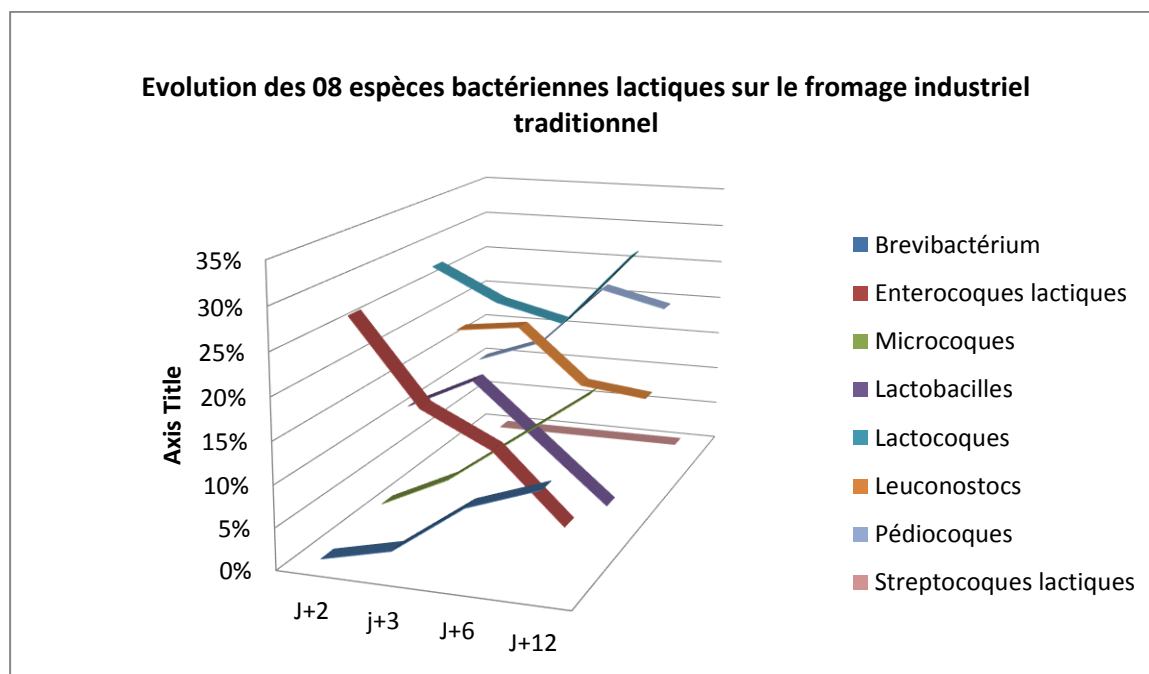


Figure 3. Evolution des 08 espèces bactériennes lactiques sur le fromage industriel traditionnel

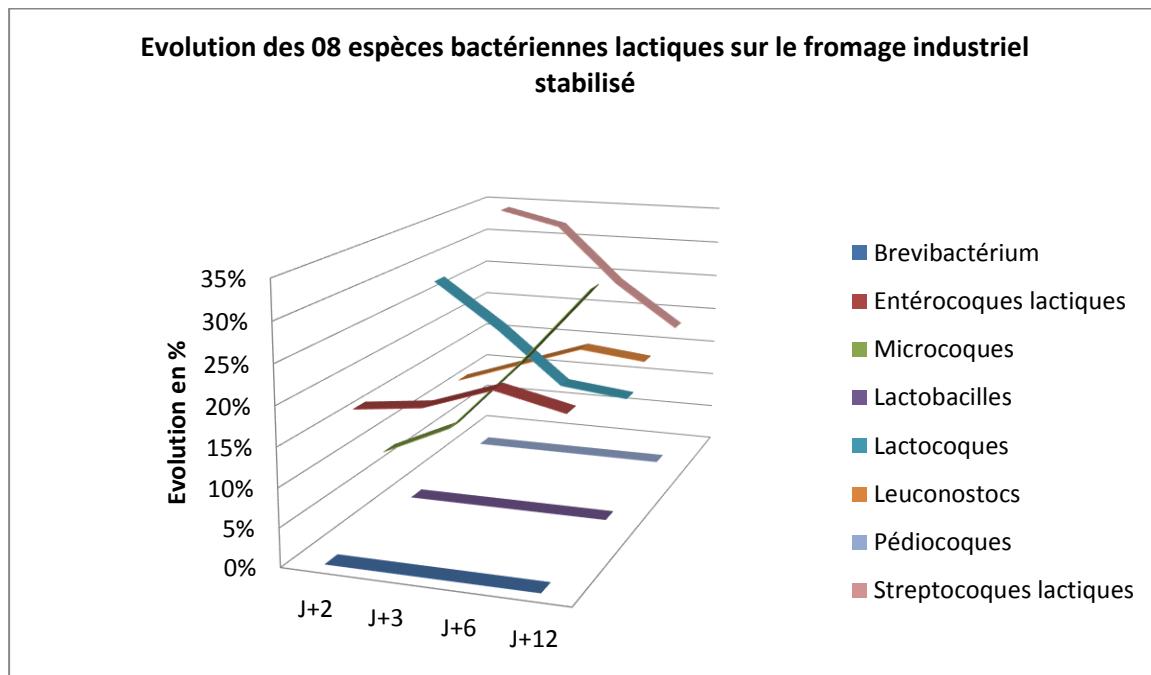


Figure 4. Evolution des 08 espèces bactériennes lactiques sur le fromage industriel stabilisé

3. Détermination de la concentration en cellules viables des deux types de fromage

La détermination de la concentration moyenne en cellules bactériennes viables a été effectuée au fur et à mesure de l'avancement de l'affinage. On constate que les proportions de dominance sont différentes tout au long de l'affinage à cause des réactions biochimiques et des interactions bactériennes qui s'opèrent et qui sont à l'origine de la croissance séquentielle de certains groupes par rapport à d'autres (figures 5, 6, 7 et 8). Parmi les principaux facteurs d'induction de déclin de croissance de certaines bactéries, il convient de signaler la présence de la flore acidifiante dont les lactobacilles et les streptocoques et la prolifération exponentielle d'autres telles que la flore halotolérante. On remarquera également l'influence de certains facteurs physico-chimiques dont la température, le pH du substrat fromager sans oublier le choc osmotique induit par le salage, ce qui provoque la destruction de certaines cellules bactériennes et la libération de leur contenu intracellulaire composé d'enzymes ayant un rôle important dans le développement de la flaveur et de la texture au fromage, ainsi que des acides nucléiques, des vitamines et des minéraux pouvant directement ou indirectement, stimuler la croissance d'autres microorganismes (Lortal et Chapot-Chartier, 2005).

Dans la pâte fromagère traditionnelle, les Entérocoques et les Lactobacilles majoritaires en début d'affinage à cause d'une croissance préalable dans le lait, deviennent presque non cultivables en fin d'affinage. Les autres souches lactiques sont présentes et cultivables tout au long de l'affinage pour les deux types de fromage. La flore halotolérante représentée par les Microcoques et les Brevibactériums évolue après le salage pour devenir deux microflores cultivables majoritaires en fin d'affinage.

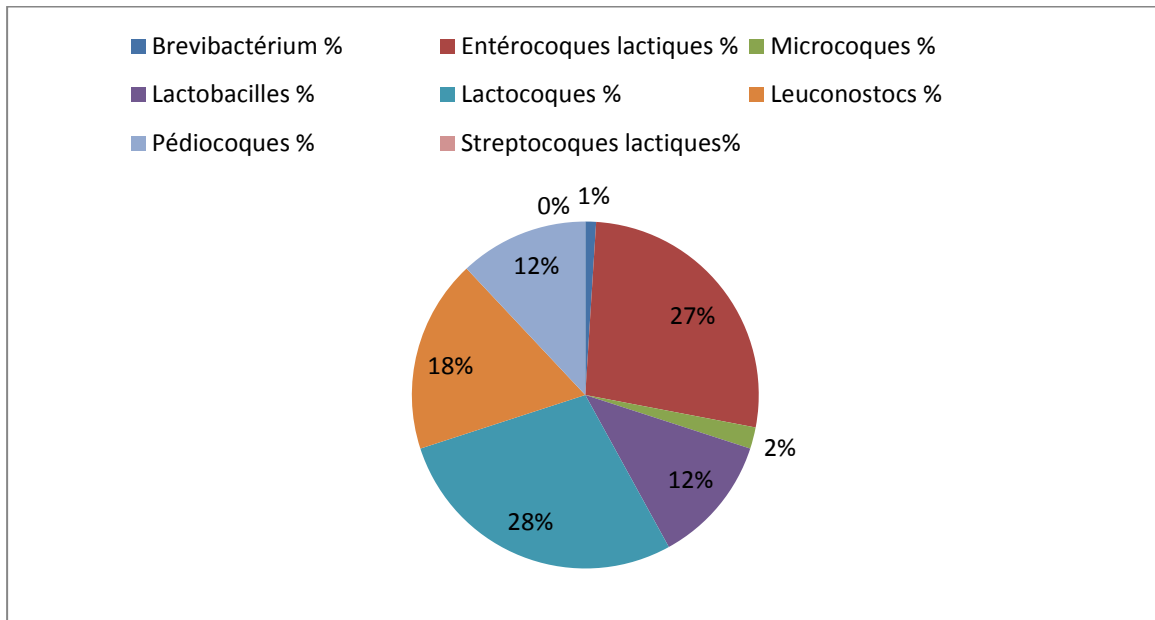


Figure 5. Cellules viables à J+2 pour le fromage industriel de type traditionnel

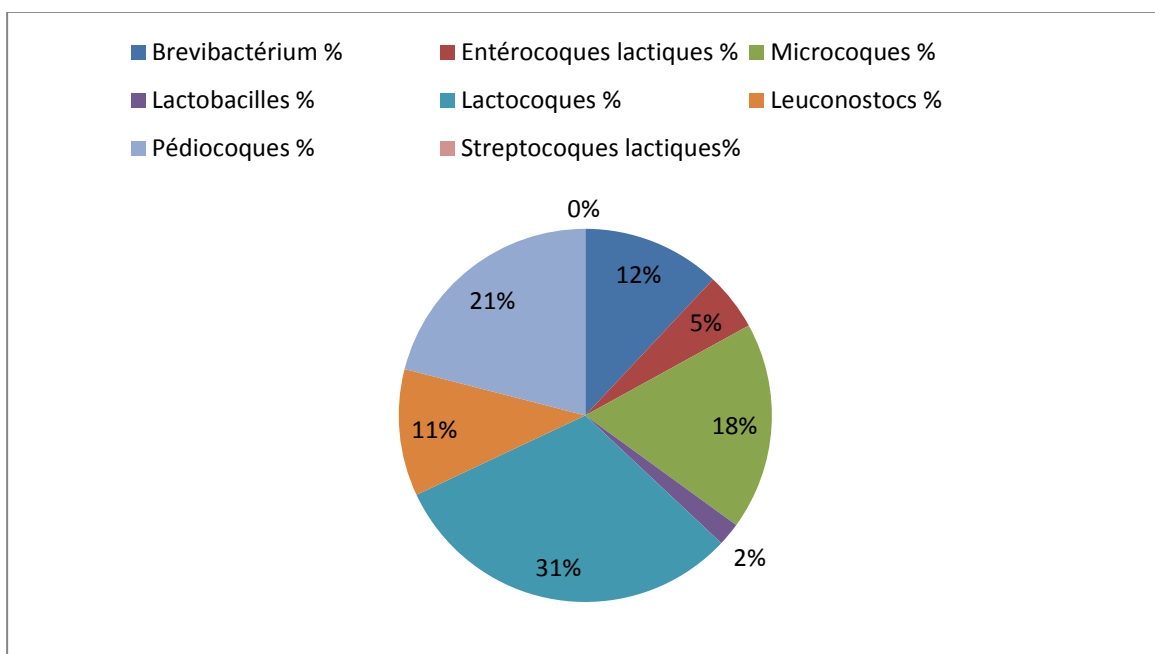


Figure 6. Cellules viables à J+12 pour le fromage industriel de type traditionnel-

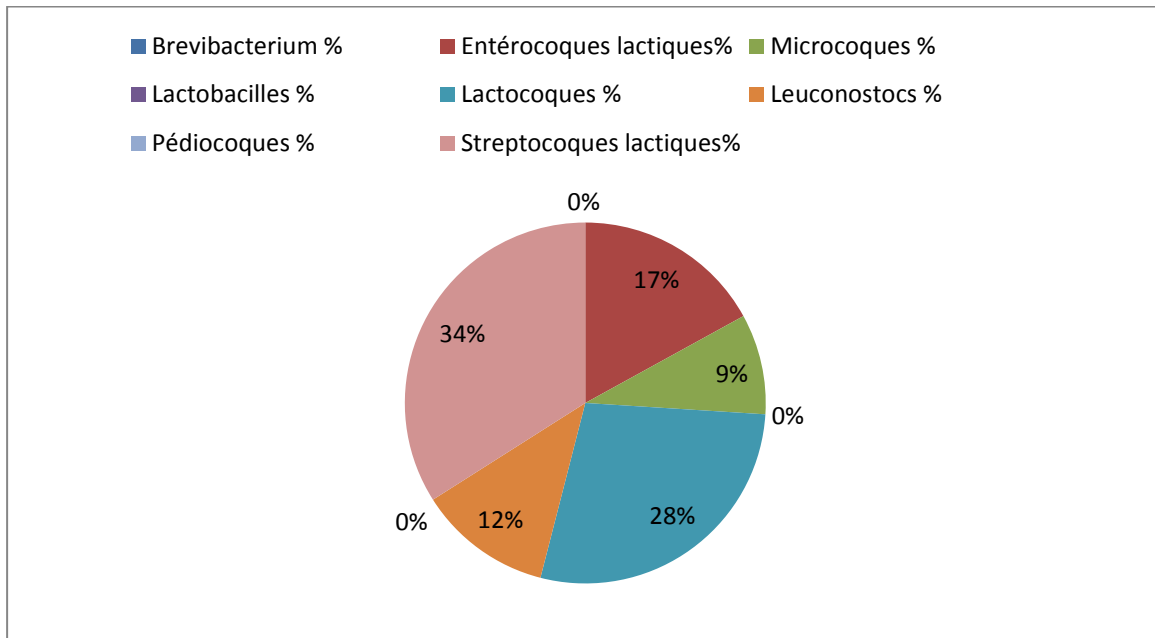


Figure 7. Cellules viables à J+2 dans le fromage industriel de type stabilisé

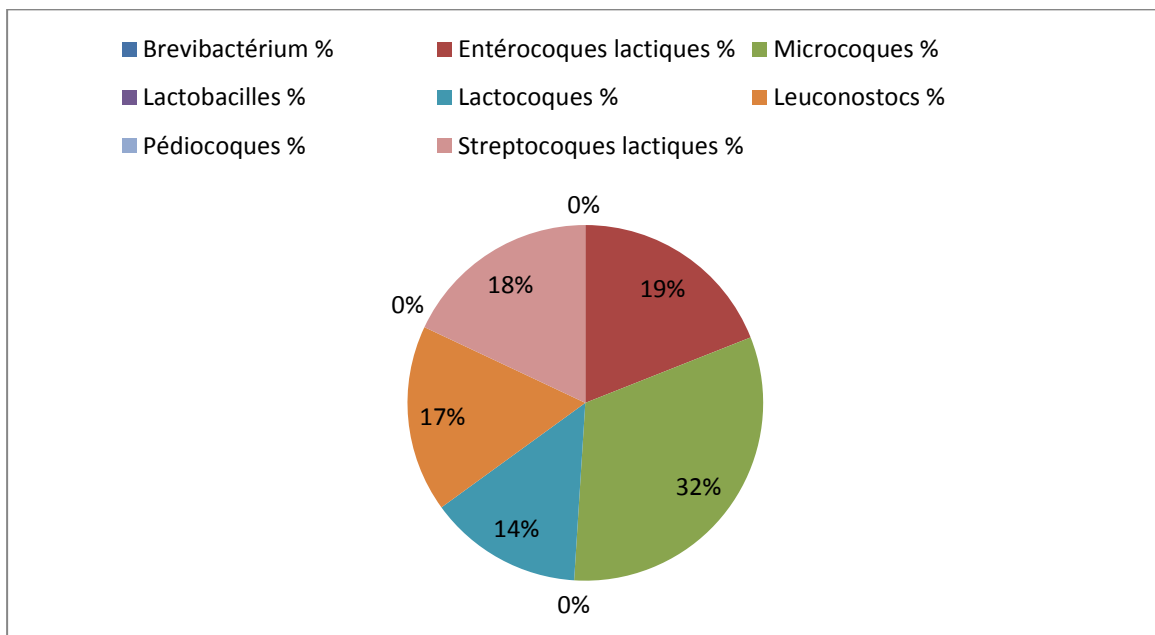


Figure 8. Cellules viables à J+12 dans le fromage industriel de type stabilisé

4. Identification phénotypique des isolats purifiés par les galeries API Biomérieux

La connaissance de la diversité des flores lactiques et halotolérantes fut d'abord acquise par des méthodes d'isolement et d'identification classiques (Tableau 17), méthodes enrichies en deuxième lieu par des analyses phénotypiques à base des galeries API par le test de la dégradation des carbohydrates indispensable pour identifier l'espèce bactérienne et même la sous-espèce.

Cette technique a confirmé la typicité des espèces avec les isolats purifiés pour les deux fromages de type traditionnel et de type stabilisé (Tableaux 18 et 19), telle que cela été

rapportée par de nombreuses études établies dans ce sens (**Irlinger et al., 2000 ; Jany et al., 2008 ; Montel et al., 2012**).

Tableau 17. Coloration de gram et tests d'oxydo-réduction des souches bactériennes identifiées

Espèce apparentée Par API galleries	Fromage de type traditionnel			Fromage de type stabilisé		
	Coloration de Gram	Catalase	Oxydase	Coloration de Gram	Catalase	Oxydase
Brevibacterium	+	+	-	+	+	-
Enterocoques	+	-	-	+	-	-
Lactobacilles	+	-	-	+	-	-
Lactocoques	+	-	-	+	-	-
Leuconostocs	+	-	-	+	-	-
Microcoques	+	+	-	+	+	-
Pédiocoques	+	-	-	+	-	-
Streptocoques	+	-	-	+	-	-

Sur le groupe de lactobacilles isolés, des espèces thermophiles homofermentaires strictes, fermentant les hexoses, produisent exclusivement du lactate mais ne fermentent pas les pentoses ont été après identification phénotypique attribuées à deux espèces *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis*. Le deuxième groupe mésophile hétérofermentaire facultatif, fermente les hexoses en lactate, en acétate et en éthanol avec une espèce identifiée de *Lactobacillus casei*. Un troisième groupe toujours mésophile mais hétérofermentaire strict est représenté par *Lactobacillus fermentum*, qui fermente les hexoses en lactate, en acétate avec dégagement du CO₂.

Tableau18. Résultats des identifications par galeries API

Espèces bactériennes	Par API 50 CHL	% I.D	Par API 20 STREP	% I.D	Par API STAPH	% I.D	Par API CORYNE	% I.D
<i>Br linens</i>							+	85
<i>En Faecium</i>			+	92				
<i>En Faecalis</i>			+	88				
<i>En sulfureus</i>			+	90				
<i>Lb acidophilus</i>	+	75						
<i>Lb casei</i>	+	80						
<i>Lb delbrueckii</i>	+	95						
<i>Lb fermentum</i>	+	85						
<i>Lc subsp cremoris</i>			+	95				
<i>Lc lactis</i>			+	98				
<i>Lc subsp lactis</i>			+	85				
<i>Lc diacetylactis</i>			+	70				
<i>Leuc cremoris</i>	+	72						
<i>Leuc mesenteroide</i>	+	75						
<i>Leuc lactis</i>	+	82						
<i>Mic luteus</i>					+	92		
<i>Mic xylosus</i>					+	85		
<i>Péd acidilactici</i>	+	74						
<i>Péd pentosaceus</i>	+	75						
<i>Strept thermophilus</i>			+	95				

% I.D : % identification , Br : Brevibacterium, En : Enterococcus, Lb : Lactobacillus , Lc : Lactococcus , Leuc : Leuconostoc , Mic : Microcococcus , Ped : Pediococcus , Strept : Streptococcus

Parmi la flore lactique d'acidification, il a été identifié des Lactocoques qui ne résistent pas à la température de 45°C, présentent un développement positif à 6,5% de NaCl et produisant de l'acétoïne. Il s'agit des espèces de *Lactococcus subsp cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus subsp lactis* et *Lactococcus diacetylactis*, alors que parmi les Streptocoques thermorésistants figure l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

Quant aux Leuconostocs, ils présentent tous un développement positif à 37°C, fermentent le citrate en produisant du CO₂. Les espèces identifiées sont *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc mesenteroide* et *Leuconostoc lactis*.

Tableau 19. Bilan des espèces bactériennes identifiées phénotypiquement par les galeries API

Espèces bactériennes	Au démoulage A J+2		Après salage A J+3		Au 4 ^{ème} jour d'affinage A J+6		Au 10 ^{ème} jour d'affinage A J+12	
	FA	FB	FA	FB	FA	FB	FA	FB
<i>Brevibactérium linens</i>	0	0	1	0	1	0	3	0
<i>En faecium</i>	1	1	1	1	1	2	1	2
<i>En faecalis</i>	1	1	0	1	0	1	0	2
<i>En sulfureus</i>	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>Lb acidophilus</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Lb casei</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Lb delbrueckii</i>	2	0	1	0	1	0	0	0
<i>Lb fermentum</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lc subsp cremoris</i>	1	2	1	2	1	1	2	1
<i>Lc lactis</i>	2	1	1	1	1	1	2	1
<i>Lc subsp lactis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Lc diacetylactis</i>	1	1	1	1	1	0	2	0
<i>Leuc cremoris</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Leuc mesenteroide</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Leuc lactis</i>	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	1	0	2	0	2	0
<i>Micrococcus xylosus</i>	1	0	1	0	1	1	1	2
<i>Pédiococcus acidilactici</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Pédiococcus pentosaceus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0	5	0	2	0	2	0	1

FA : Fromage industriel de type traditionnel , FB :Fromage industriel de type stabilisé , En: *Enterococcus* , Lb : *Lactobacillus* , Lc : *Lactococcus* , Leuc : *Leuconostoc*

Deux *Pediococcus* mésophiles homofermentaires ont été décelés, incapables d'utiliser le lactose, résistent au sel et participent aussi à la maturation protéolytique du camembert industriel traditionnel, parmi lesquels *Pediococcus acidilactici* acidophile (croissance à pH 5), ne fermente pas le maltose et *Pediococcus pentosaceus* qui utilise le maltose.

Parmi les espèces protéolytiques et lipolytiques, trois espèces d'entérocoques lactiques ont été identifiées, à savoir *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus sulfureus* qui, biochimiquement sont citrate négatif, se développent à pH 9,6 et en présence de 6,5% de NaCl. D'un autre côté, des espèces halotolérantes lipolytiques et protéolytiques avec une croissance optimale à 15°C, gram+, catalase+ et oxydase- ont été classées parmi les espèces appartenant à *Micrococcus luteus*, *Micrococcus xylosus* et *Brevibactérium linens* (Tableau 20)

Tableau 20 : Identification des 104 isolats par les galeries API

Isolats identifiés	Galerie API utilisée	Espèce identifiée
Lactocoques	API 50 CHL	22 <i>Lactococcus lactis</i> 05 <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> 03 <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>
Leuconostocs	API 50 CHL	05 <i>Leuconostocs cremoris</i> 02 <i>Leuconostocs lactis</i> 06 <i>Leuconostocs mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>
Lactobacilles	API 50 CHL	07 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 02 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 01 <i>Lactobacillus casei</i> 01 <i>Lactobacillus fermentum</i>
Pédiocoques	API 50 CHL	03 <i>Pédiococcus acidilactici</i> 02 <i>Pédiococcus pentosaceus</i>
Entérocoques	API RAPID STREP	15 <i>Enterococcus faecium</i> 02 <i>Enterococcus faecalis</i> 02 <i>Enterococcus sulfueus</i>
Streptocoques lactiques	API RAPID STREP	10 <i>Streptococcus thermophilus</i>
Microcoques Brevibactériums	API STAPH API CORYNE	05 <i>Micrococcus xylosus</i> 06 <i>Micrococcus</i> 02 <i>Brevibacterium linens</i> 03 <i>Brevibacterium</i>

5. Identification génotypique des isolats purifiés

Sur les 104 isolats de bactéries lactiques isolés des échantillons de fromage issus des 03 stades de lactation ; 62 isolats ont été identifiés par PCR en appliquant la technique de l'ARNr16s (Tableaux 21, 22 et 23). Les profils obtenus ont été traités par le logiciel Gel Compar II et comparés aux profils des souches de références utilisées

Tableau 21 : Identification des bactéries lactiques et halotolérantes d'affinage isolées des fromages en basse lactation par la technique de l'ARNr16s

Souches	Identification moléculaire	% I.D
Lc10	<i>Lactococcus diacetylactis</i>	Probable à 100
Lc11	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc12	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc13	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc14	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc15	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>	Probable à 99
Lc16	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>	Probable à 99
Lc17	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc18	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc19	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Leuc6	<i>Leuconostoc cremoris</i>	Identification phénotypique
Leuc7	<i>Leuconostoc cremoris</i>	identification phénotypique
Lb3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 99
Lb4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 100
Ent8	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent9	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent10	<i>Enterococcus sulfueus</i>	Probable à 99
Ent11	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent12	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent13	<i>Enterococcus faecalis</i>	Probable à 99
Ent14	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
St4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St6	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
Mic5	<i>Micrococcus</i>	Probable à 96
Mic6	<i>Micrococcus</i>	Probable à 96
B2	<i>Brevibacterium linens</i>	Probable à 99
B3	<i>Brevibacterium</i>	Probable à 96

Tableau 22: Identification des bactéries lactiques et halotolérantes d'affinage isolées des fromages en moyenne lactation par la technique de l'ARNr16s

Souches	Identification moléculaire	% I.D
Lc1	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc2	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc3	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc4	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc5	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc6	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc7	<i>Lactococcus lactis subsp diacetylactis</i>	Probable à 100
Lc8	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc9	<i>Lactococcus lactis subsp diacetylactis</i>	Probable à 100
Leuc1	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp cremoris</i>	Probable à 100
Leuc2	<i>Leuconostoc mesenteroide cremoris</i>	Identification phénotypique
Leuc3	<i>Leuconostoc cremoris</i>	Identification phénotypique
Leuc4	<i>Leuconostoc lactis</i>	Identification phénotypique
Leuc5	<i>Leuconostoc lactis</i>	Identification phénotypique
Lb1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 100
Lb2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 100
Ent1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Probable à 100
Ent2	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent3	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent4	<i>Enterococcus sulfueus</i>	Probable à 100
Ent5	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent6	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent7	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
St1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
Mic1	<i>Micrococcus xylosum</i>	Probable à 99
Mic2	<i>Micrococcus</i>	Probable à 96
Mic3	<i>Micrococcus</i>	Probable à 96
Mic4	<i>Micrococcus xylosum</i>	Probable à 99
B1	<i>Brevibacterium</i>	Probable à 96

Tableau 23 : Identification des bactéries lactiques et halotolérantes d'affinage isolées des fromages en haute lactation par la technique de l'ARNr16s

Souches	Identification moléculaire	% I.D
Lc20	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc21	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc22	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc23	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc24	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc25	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>	Probable à 100
Lc26	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc27	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc28	<i>Lactococcus lactis</i>	Probable à 100
Lc29	<i>Lactococcus lactis subsp diacetylactis</i>	Probable à 100
Lc30	<i>Lactococcus lactis subsp diacetylactis</i>	Probable à 100
Leuc8	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp cremoris</i>	Probable à 100
Leuc9	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp cremoris</i>	Probable à 100
Leuc10	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp cremoris</i>	Probable à 100
Leuc11	<i>Leuconostoc cremoris</i>	Identification phénotypique
Leuc12	<i>Leuconostoc mesenteroide subsp cremoris</i>	Probable à 100
Leuc13	<i>Leuconostoc cremoris</i>	Identification phénotypique
Ped1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Probable à 100
Ped2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Probable à 100
Ped3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Probable à 100
Ped4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Probable à 100
Ped5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Probable à 100
Lb5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 100
Lb6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 100
Lb7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Probable à 100
Lb8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Probable à 100
Lb9	<i>Lactobacillus casei</i>	Probable à 100
Lb10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Probable à 100
Lb11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Probable à 100
Ent15	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent16	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent17	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent18	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
Ent19	<i>Enterococcus faecium</i>	Probable à 100
St7	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St8	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 100
St10	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probable à 99
Mic7	<i>Micrococcus xylosum</i>	Probable à 99
Mic8	<i>Micrococcus xylosum</i>	Probable à 99
Mic9	<i>Micrococcus</i>	Probable à 96
Mic10	<i>Micrococcus xylosum</i>	Probable à 99
Mic11	<i>Micrococcus</i>	Probable à 96
B4	<i>Brevibacterium linens</i>	Probable à 99
B5	<i>Brevibacterium</i>	Probable à 96

6. Etude de quelques aptitudes technologiques de la flore indigène isolée

6.1. Pouvoir acidifiant

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 et 18.

D'après ces résultats, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Les espèces *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* et *Lactococcus lactis subsp cremoris* sont considérées comme étant les plus acidifiantes avec une quantité d'acide lactique moyenne de 11,8 ; 11,2 et 10,8 g/l respectivement après 24h d'incubation. En parallèle, les valeurs de pH atteintes avec ces souches oscillent respectivement entre 4,66 ; 4,72 et 4,75 (Figure 9 et 10)

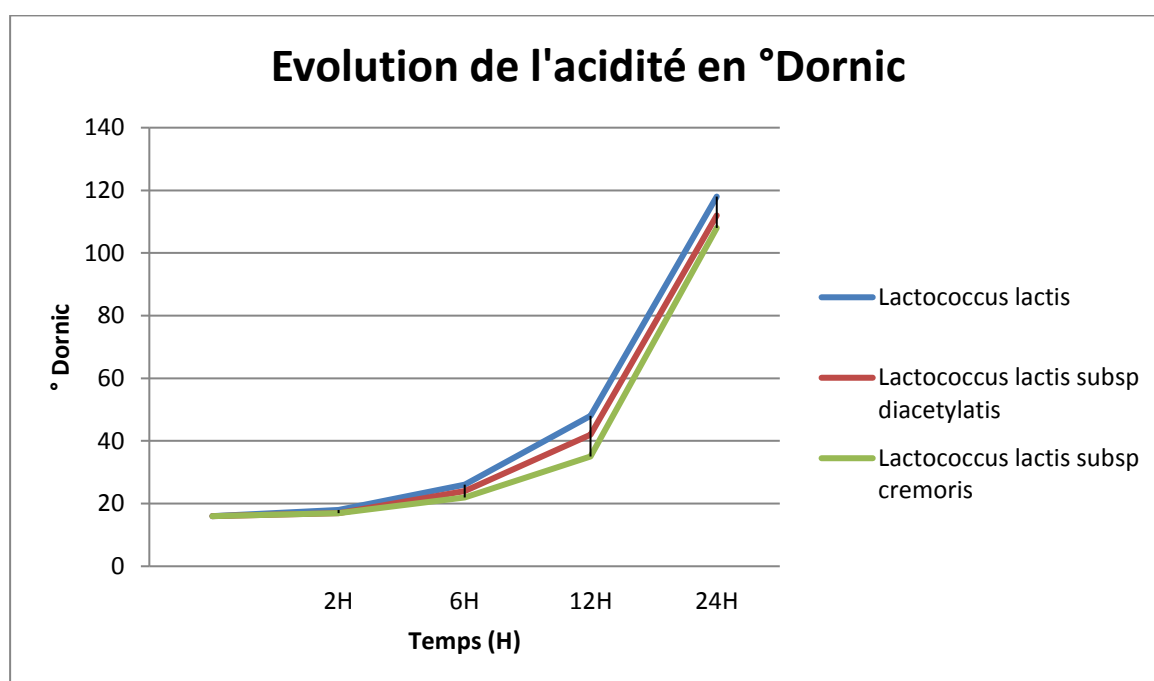


Figure 9: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactococcus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

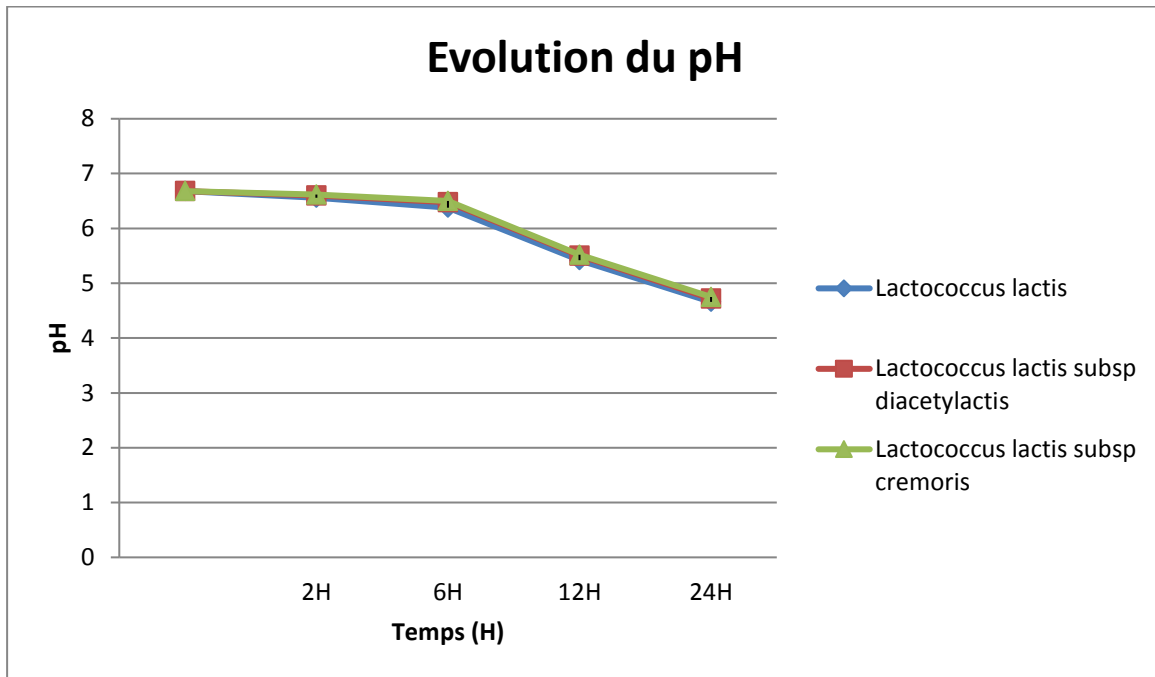


Figure 10: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactococcus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Les espèces *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus casei* ont manifesté un pouvoir acidifiant variant avec une quantité d'acide lactique moyenne de 9,8 g/l (pH = 4,82), 11,2 g/l (pH = 4,74), 10,5 g/l (pH = 4,75) et 10,1 g/l (pH=4,78) respectivement après 24h d'incubation (Figure 11 et 12).

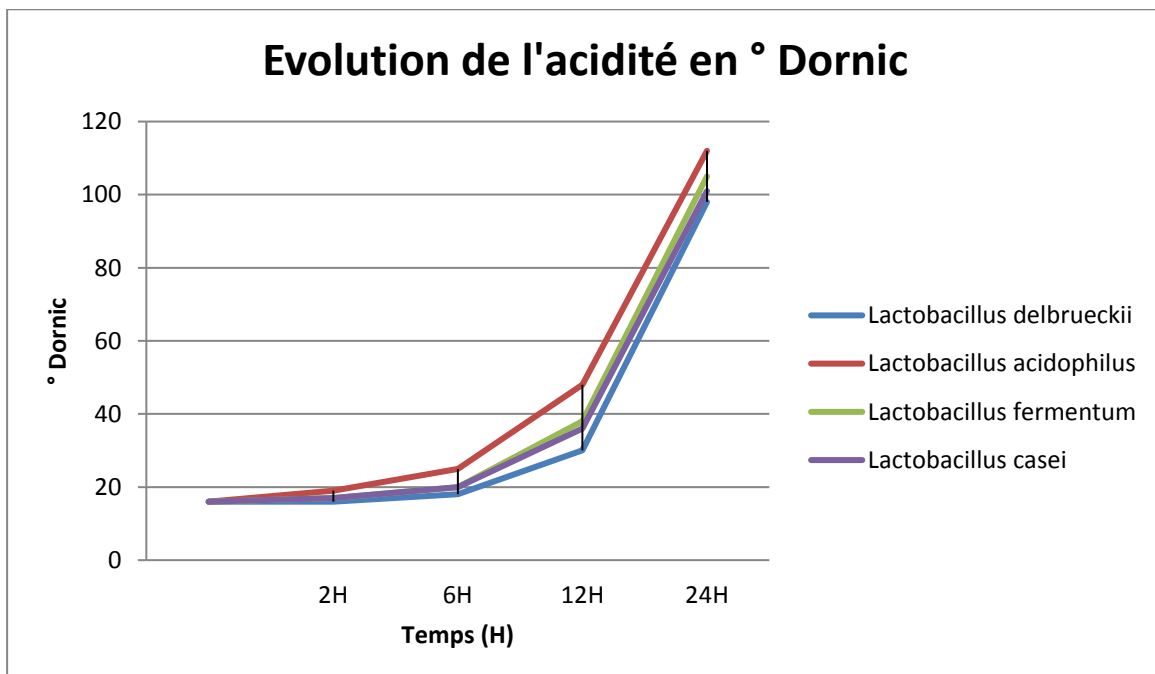


Figure 11: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactobacillus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

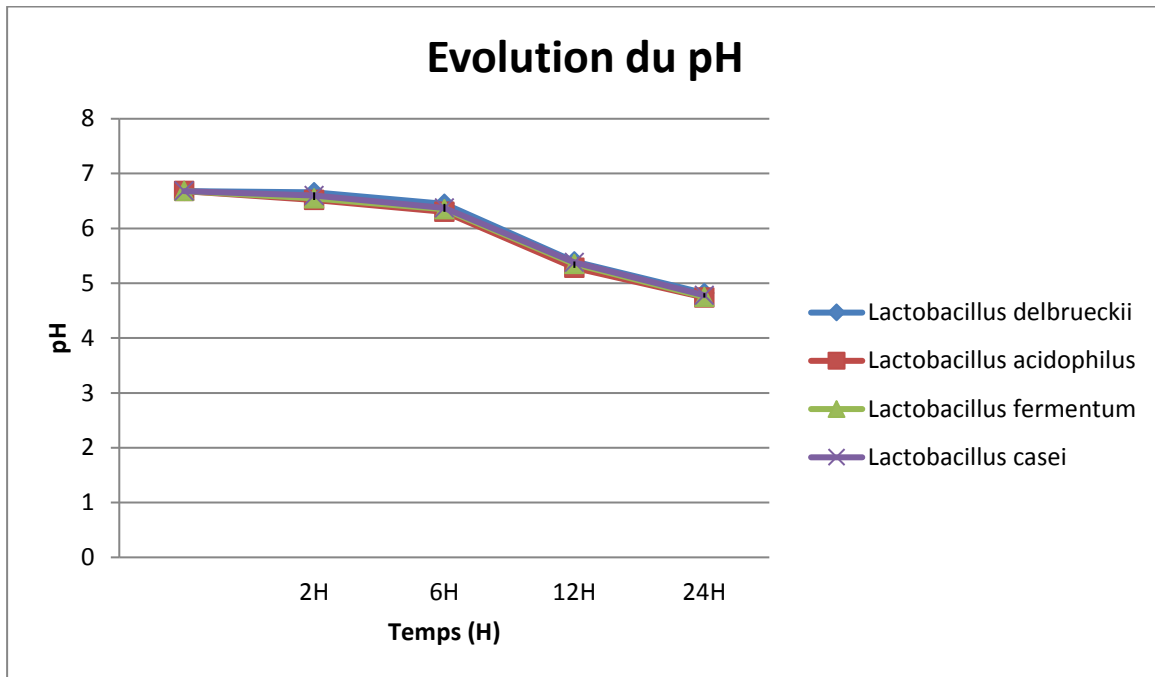


Figure 12: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Lactobacillus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Le pouvoir acidifiant des souches de *Leuconostoc* est caractérisé par des teneurs d'acide lactique en g/L de lait variant de 9,8 ; 10,2 et 11,5 g/L et des valeurs de pH correspondantes de 4,83 ; 4,68 et 4,61 pour respectivement les espèces *Leuc. Lactis*, *Leuc. cremoris* et *Leuc. mesenteroide cremoris* (Figure 13 et 14).

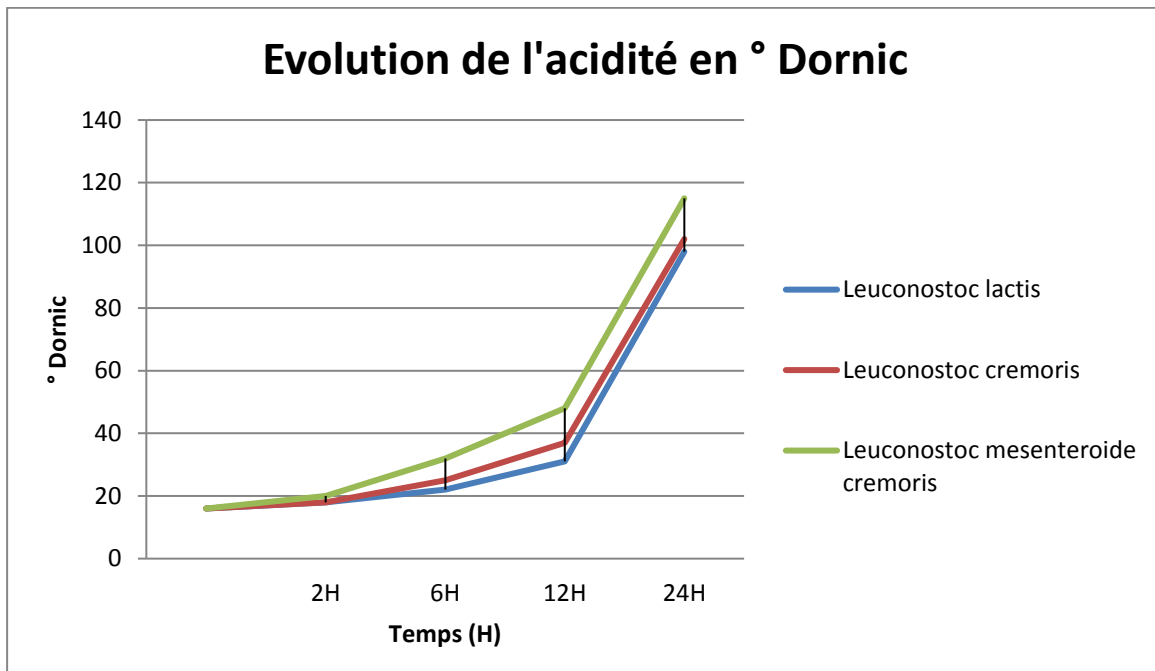


Figure 13 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Leuconostocs* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

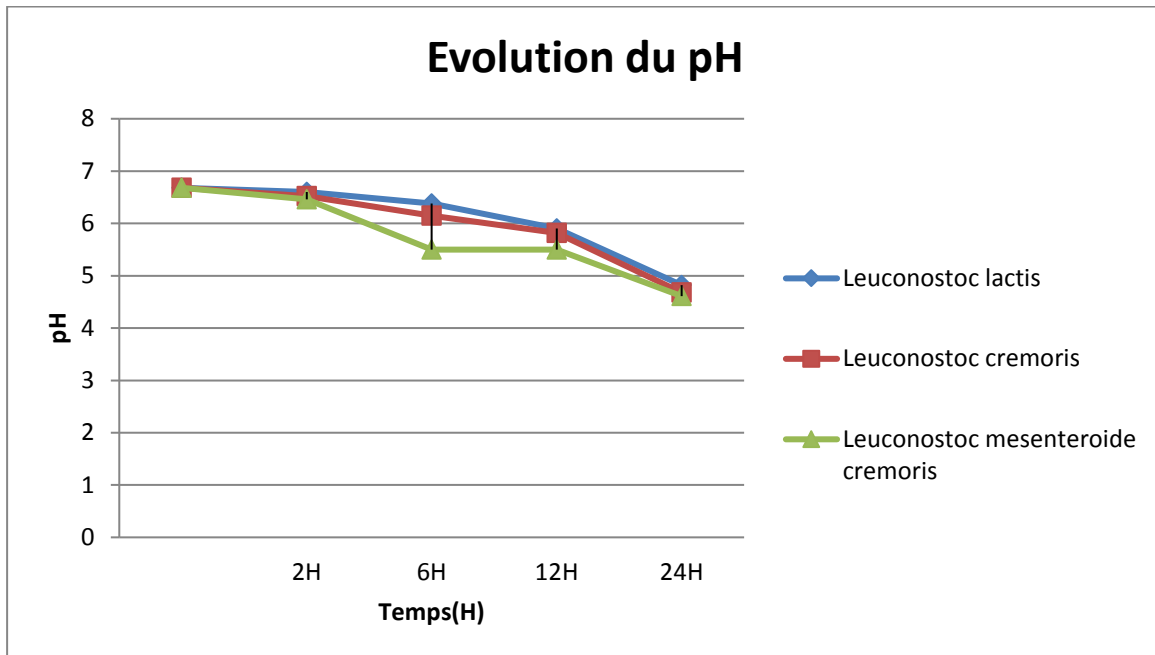


Figure 14 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Leuconostocs* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

En ce qui concerne les espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus sulfueus*, elles sont moins acidifiantes, soit des valeurs respectives de l'ordre de 8,3 et 8,5 g/L d'acide lactique (pH respectifs correspondants 5,05 et 5,03), contrairement à l'espèce *Enterococcus faecium* qui a enregistré une teneur de l'ordre de 12,1 g/L d'acide lactique et un pH correspondant à 4,59. *Streptococcus thermophilus* a manifesté un pouvoir acidifiant variant avec une quantité d'acide lactique moyenne de 8,5 g/l (pH = 5,04)

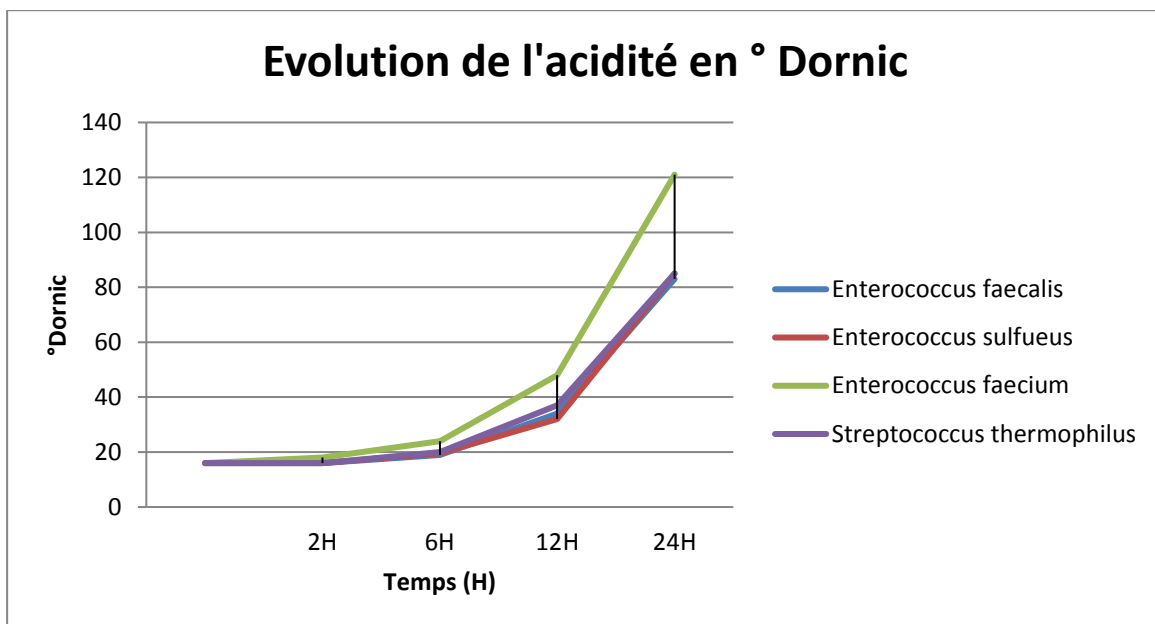


Figure 15: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Enterococcus* et *Streptococcus thermophilus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

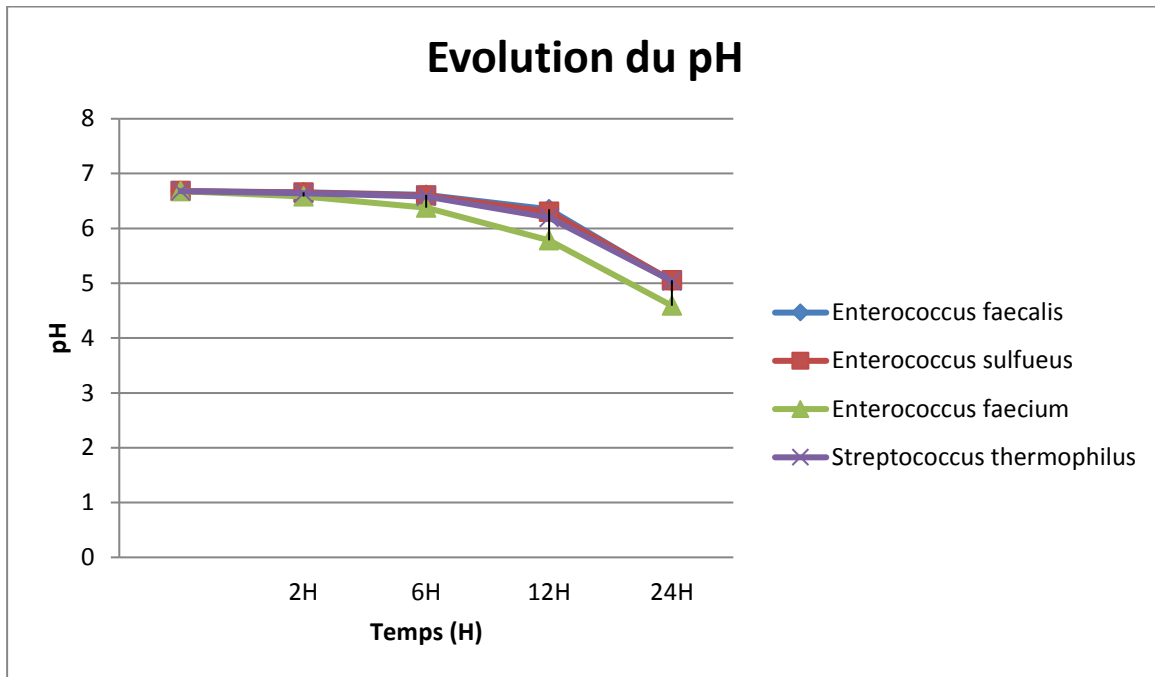


Figure 16: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *Enterococcus* et *Streptococcus thermophilus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

Enfin pour *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus*, ces deux espèces produisent respectivement 9,2 et 9,5 g/L d'acide lactique en 24 heures d'incubation pour des valeurs de pH de 4,91 et 4,87.

L'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches d'une même espèce, résultat logique comme fut rapporté par **Luquet et Corrieu (2005)**.

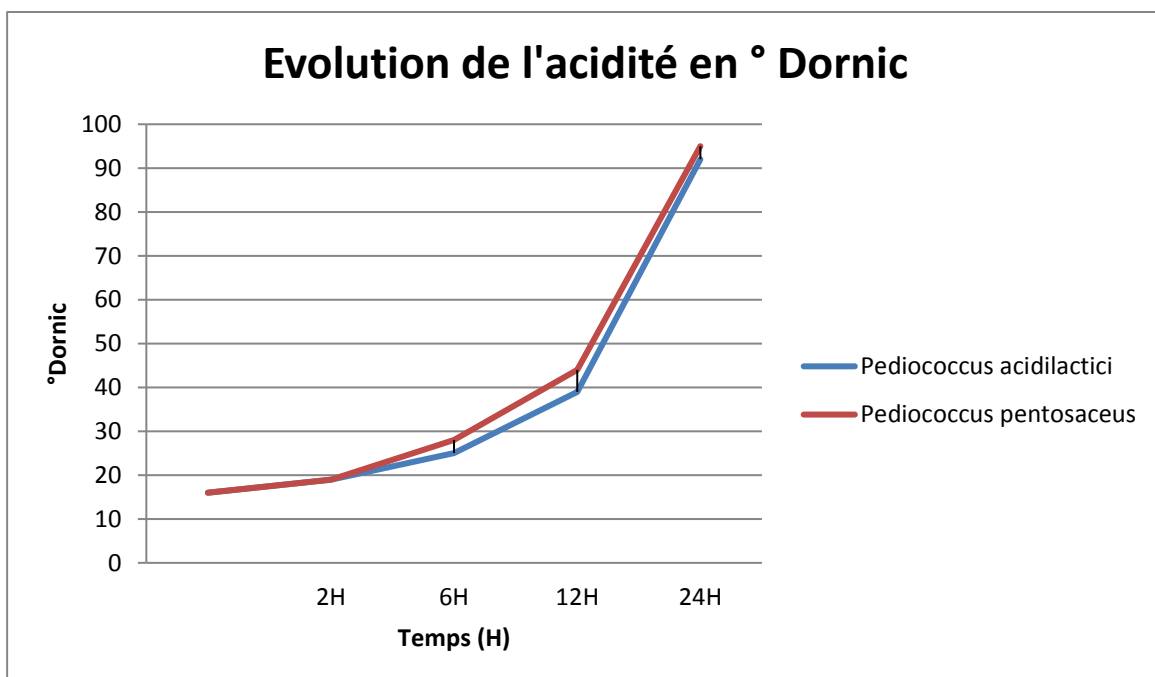


Figure 17: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *pédiococcus* : Evolution de l'acidité en ° Dornic après 24 H d'incubation

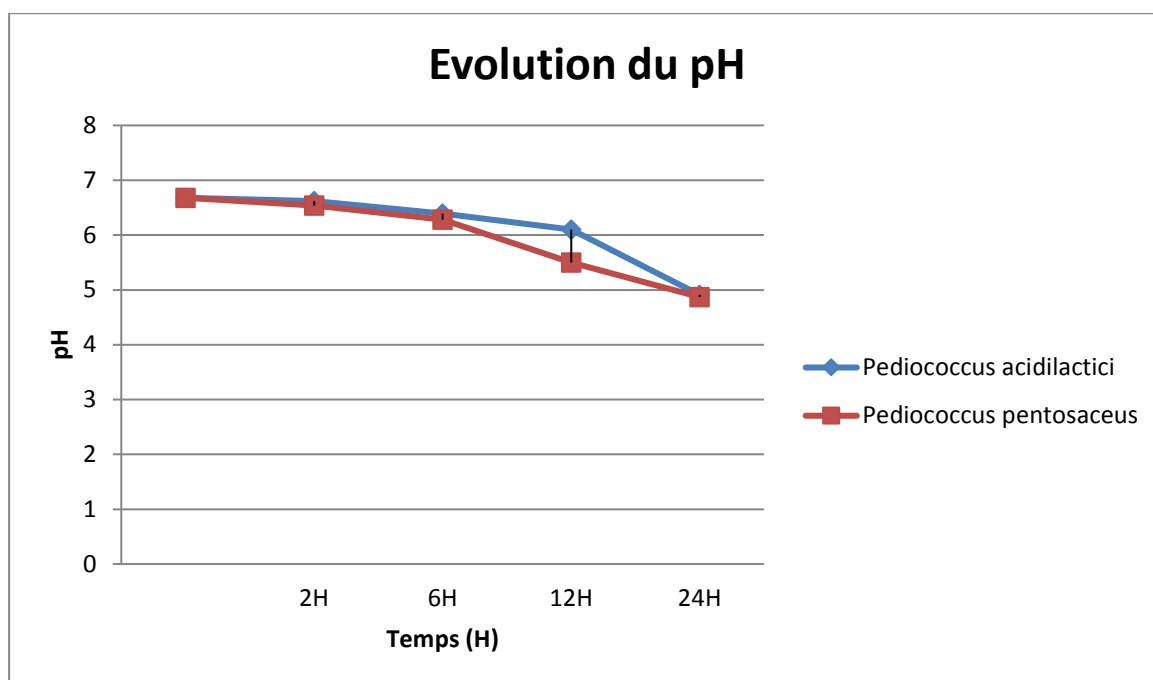


Figure 18: Pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées *pédiococcus* : Evolution du pH après 24 H d'incubation

6.2. Pouvoir protéolytique

Les résultats obtenus lors de ce test sont résumés dans le tableau 24. L'analyse de ces résultats fait ressortir que toutes les souches étudiées ont présenté une croissance avec une activité protéolytique qui s'est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques.

Selon **Veuillemard, (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches se sont révélées protéolytiques et dont les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 4 et 13mm.

Il apparaît clairement que l'espèce *Micrococcus xylosus* est fortement protéolytique comparativement aux autres espèces avec une moyenne de 14mm de diamètre, suivi de *Lc. lactis* 13mm, *Lactobacillus delbrueckii* et *Pediococcus acidilactici* 12mm, *Lactobacillus acidophilus* 10mm, *Lactobacillus fermentum* et *Brevibacterium linens* 9mm et enfin *Lactobacillus casei* 8mm (Figure 19). Ces résultats sont largement en accord avec ceux obtenus par **Leclercq-perlat M.N,2011** , **Lefrileux et al.,2016** et **Savijokie et al.,2006**.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques nécessaires à la maturation des fromages.



Micrococcus xylosum

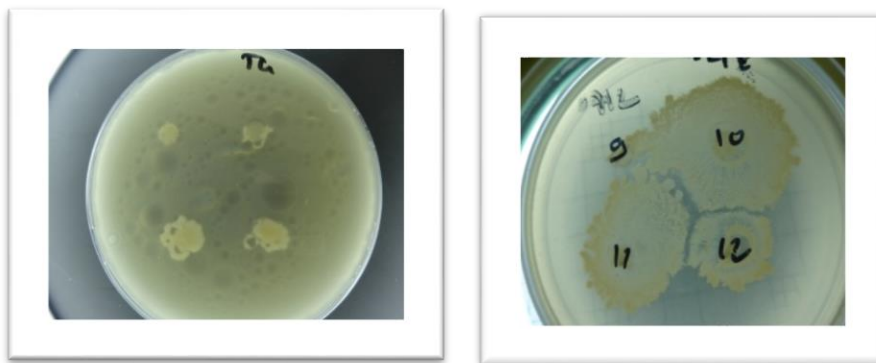
Lactococcus lactis

Lactobacillus delbrueckii

Figure 19: Pouvoir protéolytique chez certaines espèces de bactéries lactiques et halotolérantes

6.3. Pouvoir lipolytique

Les résultats de l'activité lipolytique des souches lactiques sont reportés dans le tableau 24. D'après ces résultats, il apparaît que les bactéries lactiques isolées ont présenté une activité lipolytique en formant des dépôts autour des disques de croissance dont on estime les diamètres. Il s'agit par ordre d'importance de *Brevibacterium linens* 12 mm, *Micrococcus xylosum* 10 mm, *Lactobacillus delbrueckii* et *Pediococcus acidilactici* 9mm, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* 7mm, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Streptococcus thermophilus* 6mm et enfin *Lactobacillus casei* 5mm (Figure 20)



Brevibacterium linens

Micrococcus xylosum

Figure 20: Pouvoir lipolytique chez certaines espèces de bactéries halotolérantes

6.4. Pouvoir texturant

La quantification des EPS produits a porté sur les espèces présentant des résultats positifs sur la gélose hypersaccharosée. L'ensemble des résultats est illustré dans le tableau 24.

Ce test a montré que les souches isolées de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus casei* ont développé des colonies texturantes et gluantes. Le développement de ces espèces sur un milieu hypersaccharosé en formant des colonies à aspect large et gluant témoigne une production d'un agent épaississant, les exopolysaccharides (Figure 21).

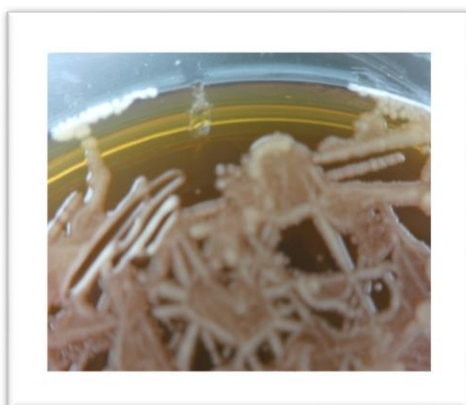


Figure 21: Aspect des colonies gluantes sur milieu hypersaccharosé

Ces observations rejoignent celles **Montel et al., 2005** et **Thompson et al., 1994** qui ont rapporté que l'espèce *Lactobacillus delbrueckii* est capable de produire des EPS, en culture pure comme en association avec *St. thermophilus*.

La production des EPS par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (**Walling et al., 2001**). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans les ferments lactiques lors de la production fromagère est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. Les spécialistes fromagers ont démontré que l'utilisation de *Lactobacillus casei*, souche productrice d'EPS, dans la fabrication de fromage prévient la réduction de sa rigidité durant sa maturation.

6.5. Pouvoir aromatisant

La production de composés d'arômes par les espèces identifiées (Tableau 24) est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés. D'après la figure 22, il apparaît que les espèces arrivent à produire des arômes (acétoïne) comme le confirme la formation de l'anneau rouge, c'est ainsi que grâce à ce pouvoir aromatisant, les espèces lactiques contribueront aux caractéristiques organoleptiques des fromages.

Certaines espèces de bactéries lactiques isolées des 02 fromages comme *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Enterococcus* (Figure 19) ont été testées positivement aromatiques, capables à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers tels que le diacétyle, l'acétoïne, le 2,3-butanediol et l' α -acétolactate. Des résultats similaires ont été rapportés par **Leroy et De Vuyst, (2004)** et **Raynaud et al., (2016)**. Par ailleurs, **Monnet et al., (2008)** ont montré que l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyle et/ou en acétoïne. Cette

dernière est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), elle peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique.

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car, chez ces bactéries, le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyl, d'acétoïne et de CO₂, participant aux qualités aromatiques et texturales des fromages (Raynaud et al., 2016).

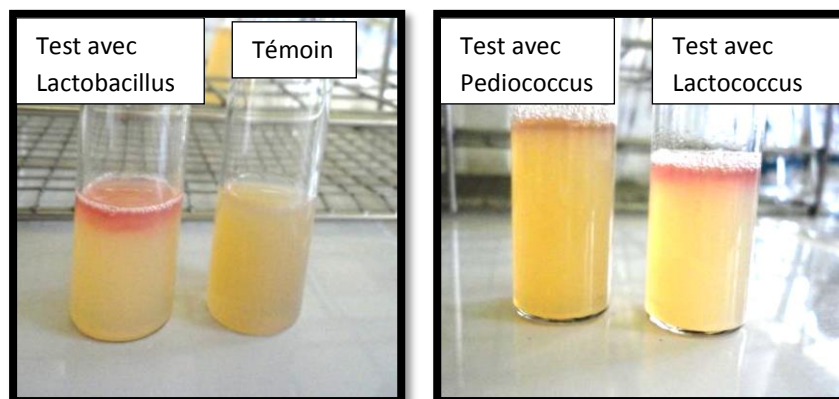


Figure 22 : Production de l'acétoïne par les isolats de bactéries lactiques

Tableau 24 : Etude de quelques aptitudes technologiques et profil fermentaire des espèces identifiées

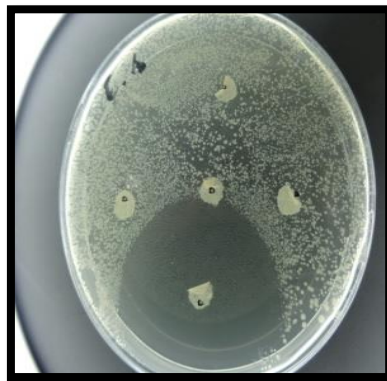
Espèces identifiées	Pouvoir protéolytique moyenne en mm	Pouvoir lipolytique Moyenne en mm	Pouvoir texturant colonies gluantes +/-	Pouvoir aromatisant Production d'acétoïne	Profil fermentaire
<i>Lc. Lactis</i>	13	5	-	-	Homo
<i>Lc. lactis subsp diacetylactis</i>	6	7	-	+	Homo
<i>Lc. lactis subsp cremoris</i>	7	5	-	+	Homo
<i>Leu.mesenteroide subsp cremoris</i>	-	-	-	-	Hétéro
<i>Leu cremoris</i>	-	-	-	-	Hétéro
<i>Leu. Lactis</i>	5	-	-	-	Hétéro
<i>Ped. Acidilactici</i>	12	9	+	+	Homo
<i>Ped.pentosaceus</i>	-	5	-	-	Homo
<i>Lb.delbrueckii</i>	12	9	+	+	Homo
<i>Lb.acidophilus</i>	10	9	+	+	Homo
<i>Lb.fermentum</i>	9	9	+	+	Hétéro
<i>Lb. Casei</i>	8	5	+	+	Hétéro
<i>Ent. Faecium</i>	-	-	-	-	Homo
<i>Ent. Faecalis</i>	-	-	-	-	Homo
<i>Ent. Sulfueus</i>	-	-	-	-	Homo
<i>St. Thermophilus</i>	-	5	+	-	Homo
<i>Mic. Xylosus</i>	14	10	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	11	7	-	-	-
<i>Br. Linens</i>	9	12	-	-	-
<i>Brevibacterium</i>	8	9	-	-	-

Lc : lactococcus, Leu : leuconostoc, Ped : pediococcus, Lb : lactobacillus, Ent: enterococcus, St : streptococcus, Mic : micrococcus, Br : brevibacterium

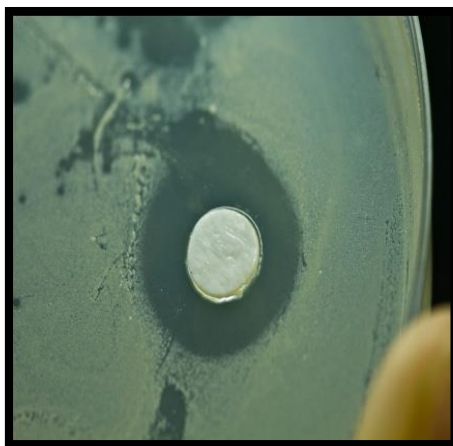
6.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de la totalité des souches lactiques isolées contre quatre souches pathogènes a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste. Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 25.

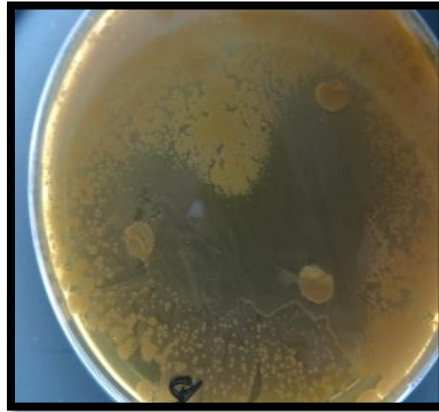
D'après ces résultats, les souches *Lactococcus* et *Lactobacillus acidophilus* présentent une activité inhibitrice plus ou moins prononcée sur les bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Salmonella sp* avec des zones d'inhibition plus ou moins importantes. En revanche, sur *E.coli* et *Bacillus subtilis*, aucune inhibition n'a été obtenue. La souche *Lactobacillus delbrueckii* produit des acides organiques a effet inhibiteur contre *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* et *E .coli*. Concernant *Pediococcus acidilactici* et *Streptococcus thermophilus*, ces deux espèces ont présenté une nette inhibition vis à vis des souches pathogènes tests de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, alors que les souches lactiques d'*Enterococcus* et ceux d'affinage halotolérantes *Micrococcus* et *Brevibacterium* n'ont manifesté aucun effet antagonistique vis-à-vis des souches pathogènes d'altération testées. Cependant, *Leuconostoc cremoris*, *Leu .mesenteroide cremoris* et *Leu. lactis* ont présenté une activité inhibitrice modérée contre *Staphylococcus aureus* (figure 23 et tableau 25).



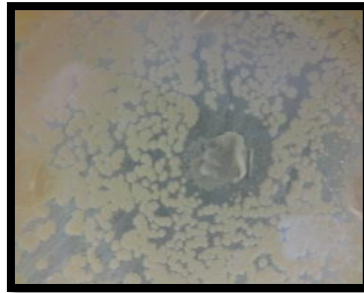
Anti-Salmonella



Anti-Escherichia coli



Anti- *Staphylococcus aureus*



Anti-*Bacillus subtilis*

Figure 23: Activité inhibitrice des espèces identifiées sur des bactéries indicatrices pathogènes et d'altération

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne exercée essentiellement par les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (Titiek *et al.*, 1996 ; Aslam et Qazi, 2010). Par ailleurs, Charlier *et al.*, (2009) ont montré que *Lactococcus sp.* et *Leuconostoc sp.* présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines. Aussi, selon Ammor *et al.*, (2006), la capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires

Tableau 25 : Activité inhibitrice des souches lactiques identifiées vis-à-vis des germes indicatrices pathogènes et d'altération

Activité inhibitrice	<i>Staphylococcus aureus</i> +/-	<i>Salmonella</i> +/-	<i>Bacillus subtilis</i> +/-	<i>Escherichia coli</i> +/-
<i>Lb. Delbrueckii</i>	+	+	-	+
<i>Lb. acidophilus</i>	+	+	-	+
<i>Lb. fermentum</i>	+	+	-	+
<i>Lb. Casei</i>	+	+	-	+
<i>St. thermophilus</i>	+	-	+	-
<i>Ped. acidilactici</i>	+	-	+	-
<i>Ped. pentosaceus</i>	+	-	-	-
<i>Leu. mesenteroide subsp cremoris</i>	+	-	-	-
<i>Leu. cremoris</i>	+	+	+	+

7. Essai de fabrication industrielle d'un fromage à pâte molle type camembert avec les isolats purifiés : Fromage fabriqué avec un microbiote contrôlé

En industrie fromagère, la qualité des fromages est largement déterminée par la perception sensorielle qui est un processus complexe. Elle est influencée par plusieurs facteurs tels que le contenu en composés aromatiques, la texture et l'apparence (Edima, 2007).

Les fromages ont été fabriqués industriellement au niveau de la Fromagerie Safilait Constantine. Les souches purifiées que nous avons réussi à cultiver, à identifier et à isoler ont été utilisées dans la transformation d'un lait épuré, innovation technologique de traitement initiale de la matière première, nécessaire à la maîtrise des populations microbiennes et l'obtention d'un fromage d'appellation d'origine contrôlée.

Les résultats des tests de dégustation du fromage fabriqué par rapport au témoin sont résumés dans le tableau 26. Les photos de la figure 24 montrent l'aspect visuel du fromage fabriqué tout en le comparant au témoin.

Tableau 26 : Résultats du test de dégustation J+12.

Examen du jury de dégustation	Note du jury sur camembert fabriqué avec les espèces sélectionnées	Note du jury sur camembert témoin de la même industrie
Examen visuel		
1-Aspect de la surface	7,25±0,25	6,85±0,35
2-Aspect de la pâte	8,05±0,38	7,35±0,48
Examen olfactif		
1-Arôme apporté par le fromage	9,10±0,58	7,15±0,26
3-Intensité aromatique	8,95±0,75	6,88±0,62
Examen gustatif		
-Saveur apportée	9,35±0,25	7,85±0,56
Appréciation général note sur 10	8,75±0,5	6,5±0,75

La qualité organoleptique du fromage fabriqué, testée par le jury de dégustation sur un ensemble de caractères, est cotée bonne. Les résultats indiquent une différence significative par rapport au témoin. Des notes de $8.75 \pm 0,5$ sont données au fromage fabriqué et $6,5 \pm 0.75$ au témoin respectivement.



Camembert témoin



Camembert de l'essai industriel

Figure 24 : Aspect visuel du camembert de l'essai industriel par rapport au témoin

7.1. L'examen visuel

Une note de $7,25 \pm 0,25$ pour l'état de la surface du camembert fabriqué par rapport au témoin $6.85 \pm 0,35$

Une note de $8,05 \pm 0,38$ pour l'aspect de la pâte du camembert fabriqué (couleur-élasticité et homogénéité) par rapport au témoin $7.35 \pm 0,48$

7.2.L'examen olfactif

Une note de $9,10 \pm 0,58$ pour les arômes du camembert fabriqué par rapport au témoin $7.15 \pm 0,26$

Une note de $8,95 \pm 0,75$ pour l'intensité aromatique du camembert fabriqué par rapport au témoin $6,88 \pm 0,62$

7.3.L'examen gustatif

Une note de $9,35 \pm 0,25$ pour la saveur apportée par le camembert fabriqué par rapport au témoin $7.85 \pm 0,56$

N.B : Voir fiche d'analyse sensorielle comparative des fromages en annexes (tableau 29)

D'après ces contrôles (microbiologique, physicochimique et organoleptique), il apparaît que le fromage fabriqué à partir du microbiote sélectionné présente des qualités supérieures au fromage fait à base du ferment industriel. Cela indique que nos souches sélectionnées possèdent des bonnes aptitudes technologiques qui peuvent être exploitées.

8. Qualité organoleptique de l'essai du camembert industriel :

Selon les critères définis au camembert de Normandie « AOC » du site web www.fromagersdefrance.com, de la norme codex pour le camembert (2010) et du Label INAO France (2009) (annexe IV), notre camembert fabriqué industriellement répond aux caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de ce fromage.

Tableau 27 : Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'essai de fabrication du camembert industriel

Caractéristiques physico-chimiques	Résultats
Format	
Diamètre	11 cm
Epaisseur	3 cm ± 0,2
Poids	250 gr ± 10 gr
G/S	45%
Taux de sel	1,2 %
Caractéristiques organoleptiques	Résultats
Aspect visuel	fine croûte duveteuse striée et bosselée, pâte de couleur jaune crème et brillante, Sous croûte ; pâte présentant de petits trous de fermentation
Texture	bien souple, crémeuse sous croûte et plus ferme au cœur
Aspect olfactif	fromage jeune avec une odeur puissante et rustique, rappelant l'étable. La pâte a un arôme marqué de lait cru.
Aspect gustatif	lactique, son goût de lait cru est suivi de notes animales qui persistent en donnant une sensation caractéristique du camembert témoin d'une bonne dynamique du microbiote utilisé

Observations : Appréciations établies Le : 10/10/2016 avec le jury du groupe LALLEMAND France composé de messieurs :

BOCHE Stephane, THOMASSEY David spécialistes fromagers et **PACCARD Joseph**, artisan affineur de fromage fermier de Savoie France et **M SEFARI** patron de la fromagerie Safilait Constantine

Idem pour la dégustation établi le 13/10/2016 avec les doctorants de l'INATAA Constantine du Laboratoire de recherche en biotechnologie et qualité des aliments

Et au Laboratoire des sciences et techniques de production animale Hassi-Mamèche Mostaganem le 19/10/2016

En plus un certificat d'excellence a été délivré à Neufchâtel-en-Bray par l'Association de Défense et de Gestion de l'AOC Camembert de Normandie, présidée par monsieur GRAINDORGE Thierry , le 17/09/2017 .(Annexe V)

9. Conclusion partielle

Globalement les résultats de nos essais concordent à ceux rapportés par la bibliographie (**Helinck et al., 2004** , **Pritchard et al., 1993**, **Zirnstein et al.,2000**), la modification continue de l'environnement de l'écosystème fromager avec des caractéristiques physiologiques différentes d'une étape à l'autre de l'affinage dont la température, le taux de sel, le pH, l'oxygène et les conditions nutritives expliquent cette différence dans l'appréciation quantitative des populations bactériennes caractérisées. D'un autre côté, la synthèse des données montre que les populations bactériennes analysées varient d'une même variété fromagère à l'autre, en fonction du lieu de production, de la période de lactation, du traitement effectué au lait et de la technologie de transformation appliquée. Le traitement du lait contrôlé a engendré une abondance d'espèces bactériennes soit 06 espèces différentes de bactéries lactiques, incluant 17 genres et 02 espèces de bactéries halotolérantes avec 03 genres.

Enfin, l'hétérogénéité phénotypique intra-espèce parmi les bactéries lactiques et halotolérantes indigènes est notable sur le fromage industriel traditionnel à pâte molle de type camembert par rapport au fromage industriel de type stabilisé, où cette technologie nécessite grâce au savoir-faire du fromager, la maîtrise du microbiote endogène apporté initialement par le lait et complété par un autre exogène aux propriétés biochimiques spécifiques très ciblées afin d'obtenir un équilibre contrôlé et un camembert aux propriétés intrinsèques recherchées.

La compréhension de l'évolution de l'écosystème microbien au cours de l'affinage influençant les qualités organoleptiques du camembert est donc d'une importance capitale pour améliorer sa valeur intrinsèque. Les innovations technologiques de traitement du lait, loin de la tradition, se sont imposées pour faciliter la maîtrise des populations microbiennes et de leur dynamique par une uniformisation et, une standardisation des caractéristiques organoleptiques et sensorielles des fromages à appellation d'origine contrôlée (**Leveau et al., 1993** ; **Yvon et al., 2001** ; **Eigel et al., 2001** ; **Masoud et al., 2003** ; **Upadhyay et al., 2004** ; **Eck, 2006** **Leclercq-Perlat et al., 2011**).

Selon l'intérêt de chaque espèce bactérienne isolée et ses effets sur les plans technologique et sensoriel, cette étude est une contribution qui vise à apporter aux industriels l'approche scientifique qui assurerait une meilleure maîtrise de la technologie de transformation fromagère et qui permettrait ainsi d'apprécier d'autres souches aux propriétés intéressantes en fonctions des aptitudes technologiques et de certifier l'appellation d'origine contrôlée « A.O.C »aux fromages.

Chapitre IV- Conclusion générale et perspectives

L'étude entamée a spécifié la nature des bactéries de 02 camemberts fabriqués industriellement avec deux technologies différentes. L'évolution relativement récente des méthodes de transformation du lait a pu entraîner une modification de sa flore naturelle et par conséquent, celles des fromages. Par ailleurs, l'existence des variations saisonnières d'une fromagerie à l'autre a donné une caractérisation et une population bactérienne différente. Selon l'intérêt de chaque espèce bactérienne isolée et ses effets sur les plans technologiques et sensoriels, ce modeste travail est une contribution dans le sens d'apporter aux industriels l'approche scientifique nécessaire à la maîtrise de la technologie de transformation fromagère

Les résultats de cette étude nous ont permis d'avoir une idée sur la composition de la flore microbiologique en bactéries lactiques et d'affinage de deux fromages industriels à pâte molle type camembert fabriqué au lait de vache avec deux technologies différentes. Ces produits montrent une très grande diversité d'espèces qui dépend des régions et des saisons, avec au total 104 espèces identifiées avec des incidences différentes. La comparaison des résultats obtenus dans ce travail avec ceux des autres travaux sur le camembert d'origine, permet de conclure que l'Algérie dispose d'une biodiversité riche et particulière, et que ses produits laitiers traditionnels peuvent être une source précieuse de souches avec des propriétés technologiques intéressantes. Les profils obtenus par PCR montrent que la grande majorité des souches isolées sont différentes et qu'il n'y a pas de relation de clonalité entre elles, ce qui signifie qu'on dispose d'un ensemble de souches avec des propriétés potentiellement différentes. A ce titre, on peut considérer la collection de bactéries lactiques et d'affinage isolée dans ce travail comme un réservoir national de bactéries à grande valeur nutritionnelle, biotechnologique et probiotique.

La connaissance presque parfaite du microbiote initial des laits transformés par région et par phase de lactation, la maîtrise des traitements préliminaires, le choix de la technologie adéquate et des ferments ajoutés avec un suivi obstiné des fromages en affinage a procuré au camembert fabriqué industriellement sa noblesse, celle d'un aliment qui porte en lui toute son histoire, jouissant tout autant d'une saveur incomparable ayant procuré le plus grand plaisir aux dégustateurs.

En guise de perspectives, le travail que nous avons mené n'est évidemment pas exhaustif, compte-tenu du volume des analyses établies et dont il a nécessité. Il mérite d'être complété d'une part par l'étude de la qualité sanitaire de cette population microbienne générant des barrières biologiques contre le développement des bactéries pathogènes, d'autre part par la mise en évidence de la flore fongique dont les levures et les moisissures et enfin, par la caractérisation de l'activité caséolytique et le fractionnement électrophorétique des peptidases et des aminopeptidases par les enzymes intracellulaires microbiennes d'intérêt technologique.

Références bibliographiques

Aissaoui D., Zidoune M.N., 2006. Le fromage traditionnel algérien « BOUHEZZA ». Séminaire d'animation régional. Technologie douce et procédé de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT. Tunis, Tunisie/27-28-29 Novembre 2006.

Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Buenol L. et Theodorou B., 2005. A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* **3** : 59-63.

Alomar J., 2007. Etude des propriétés physiologiques de *Lactococcus Lactis* et *Lactococcus gravierae* pour la maîtrise de *Saphylococcus aureus* en technologie fromagère .Thèse Doctorat INPL (Nancy)

Al Otaibi M .M and Wilbey A , 2004. Effects of temperature and salt on maturation of white-salted cheese . *International Journal of Dairy Technology* **57**; 57-63

Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.* **17** : 454-461.

Aslam S. et Qazi J.I., 2010. Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool.* **42**(5) : 567-573.

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* NewYork. 1-66.

Bekada A., 2005. Mise au point de la technique d'extraction d'ADN plasmique chez les bactéries lactiques et étude de la stabilité du caractère production du dextrane chez *Leuconostoc*. Mémoire de Magister .Microbiologie fondamentale et appliquée. Université Es-Sénia Oran .

Bergey's Manual, Manual of determinative bacteriology, William and Wilkin, Baltimore, (1986-1989).

Berodier A., 2005 Auteur principal . Quelles sont les évolutions de la flore microbienne dans les laits et les fromages ? Comité interprofessionnel du comité-Av .de la Résistance B.P 26-39801 Poligny cedex crée le 01/06/2005 modifiée le 30/08/2005.

Beuvier E., Buchin S., 2004. Raw milk cheeses : chemistry, physics and microbiology Timothy Academic Press. Vol 1 (2004) 319-345

Beuvier E. et Feutry F., 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. Unité de recherches en technologie et analyses laitières.

Bonaiti C. , Leclercq-Perlat M.N , Latrille E. and Corrieu G. 2004. Desacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened in controlled conditions : Influences of relative humidity and of temperature .*Journal of Dairy Science* 87 (11) : 3976-3988.

Boucher L., Ouzounis C.A., Enright A.J. ,Beloncowe B.J ,2001 .A genome-wide survey of RS domain protein "Sacharomyces genom database.US national library of medicine.Dec 2001 .P.1693-1702

Brennan N.M., Ward A.C., Beresford T.P., Fox P. F., Goodfellow M. and Cogan T.M.2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appllied and Environmental Microbiology* 68(2): 820-830.

Callon C., Millet L., Montel M.C. 2004.Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese .*Journal of Dairy Research* 71,231-244.

Canteri G.,1997 .Les agents de transformation du lait .Le fromage .3^{ème} édition Tech.Doc . Lavoisier (Paris).P187-188

Carr F.J., Chill D. et Maida N., 2002.The lactic acid bacteria .Critical Review in Microbiology.20.281-370

Casalta E.,2003.Bases scientifiques de la qualité du Venaco, fromage traditionnel au lait cru.Mise au point de ferments sélectionnés spécifiques .Thèses, Université de Bourgogne.

Champagne CP, Soullignac L, Marcotte M , Innocent J-P ,2003 Texture et evolution du pH de fromages de type Brie entreposés en atmosphere controlee . *Lait* 83: 145-151

Charlier C., Cretenet M., Even S. et Le Loir Y., 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 131 :30-39.

Choisy C., Desmazeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J.L et Tourneur C. 1997. Les phénomènes microbiens. In : Le fromage. Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier *Tec & Doc, Paris,France.* Pp. 377-446.

Cholet O., 2006. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. *Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.* 16.

Cintas L.M., Herranz C.,Hernandez P.E.,Casaus M.P. et Nes I.F. 2001. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.*Food Sci. Technol. Int.* 7: 4, 281-305.

Codex alimentarius ; codex Stan 283-1978

Cogan T.M. 1986. The leuconostocs: Milk products. In: Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods, CRC Press, Boca Raton, Florida,* pp. 25-40.

Cogan T.M. et Hill C. 1993. Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol. 1, Second Edition, *Chapman and Hall, London,* pp. 193-255.

Cogan T.M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C. et Rodriguez E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409-421.

- Corsetti A., Rossi J. and Gobetti M. 2001.** Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2): 1-10.
- Delbès C., 2015.** Ecologie microbienne: une démarche pour la maîtrise de la qualité des fromages au lait cru. INRA Communication journée Mars 2015 : Science et impact
- Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 25-116.
- Depouilly A., Dufrene F., Beuvier E., Berthier F. 2004.** Genotypic characterization of the dynamics of lactic bacterial population of comet cheese, *lait* 84:155-167
- Desmazeaud M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières. INRA. 1-3.
- Desmazeaud M.J. et Vassal L., 1979.** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles : Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait*. 587 : 327-344.
- Desmazeaud M. 1983.** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. *LeLait*. 63, 286-310.
- Desmazeaud M. et Cogan T.M. 1996.** Role of cultures in cheese ripening. In: Cogan T.M., Accolas J.P (Eds.), *Dairy Starter Cultures*. VCH Publishers, Inc., New York. pp. 207-231.
- Desmazeaud M.J. et De Roissard H. 1992.** Métabolisme général des bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques. *Ed. Lorica Uriage*. 1, 169-207.
- Desmaures N., 1995.** Etude des laits de haute qualité: caractéristiques et aptitudes microbiologiques à la transformation en camembert au lait cru. Thèse, Université de Caen.
- Dortu C. et Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13.143-154.
- Dubernet S., Desmaures N., Guéguen M., 2008.** Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Canadian Journal of Microbiology* . 54, 218-228.
- Dworkin M., 2006.** *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Bacteria : Firmicutes, Cyanobacteria* 4, 4., New York [u.a.], Springer-Verlag New York Inc.
- Eck. A , Gillis J.C ,** Le fromage , 3^{ème} édition TEC et DOC 2006 .891p
- Edima H.C., 2007.** *Carnobacterium maltaromaticum*: caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 57-66.
- Eigel E., Nicklaus S., Septier C., Salles C., and Lequere J.L. 2001.** Evolution of the taste of a bitter camembert cheese during ripening characterization of a matrix effect . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2930-2939

Fricker M., Skanseng B., Rudi K., Stassi B., Ehling-Schulz M., 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International journal of food microbiology*, 145, (2011), S24-S30

Gasson M.J., 1994. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Institute of food research. Norwich UK. 295p

Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* **29** : 591-610.

Ghaly A. E., Kamal M. and Correia L. R. 2005. Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology* 96(10): 1143-1152.

Gill A.O. et Hally R.A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.

Gill J.J., M Sabour P., Gong J., Yu H., Leslie K.E, Griffith M.W, 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactation dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *Int. J. Dairy Journal* (2006) 220-228

Gori K., Jespersen L., 2010. The language of cheese ripening cultures. *Aust. J. Dairy Technol* 65: 192-194

Gould G.W. 1991. Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients* ed. Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York. pp. 461-483.

Guessas B., Hadadji M., Saidi N. et Kihal M. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.

Guiraud J.P., 2003. *Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

Hardy J., 2004. Le chlorure de sodium dans le lait et les produits fromagers. In: *Gaucheron F. editor. Minéraux et produits laitiers, Paris, France: Lavoisier Tec et Doc* pp 619-643

Hassan A.N. et Frank J.F., 2001. Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

Helinck S., Le Bars D., Moreau D., et Yvon M., 2004. Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3855-3861.

Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. et Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl): 365-373.

Hutkins R.W., 2006. *Microbiology and technology of fermented foods.* Edit. Blackwell Publishing. P. 475.

Irlinger, F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 172 pages

Irlinger F., Layec S., Helinck S., Dugat-Bony E., 2015.Cheese rind microbial communities : diversity, composition and origin .FEMS Microbiol.Lett .362, 1-11 .doi :10.1093 : femsle/fnu015.

Irlinger F., Mounier J. 2009. Microbial interactions in cheese : implications of cheese quality and safety .Curr.Opin.Biotechnol.20, 142-148.doi :10.1016/j.copbio.2009.02.016

Jany .JL, Barbier G.,2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese .Food Microbiol 25 : 839-848

Jeantet .R . Les produits laitiers 2^{ème} édition TEC et DOC LAVOISIER 2012 . 184 p

Khalid N.M. et Marth E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73** : 158-167.

Klaenhammert R. 2000. Probiotic bacteria : Today and tomorrow. *J. Nutr.*130: 415-416.

Labioui H., Elmoualdi L., EL Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.

Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **144** : 237-250.

Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., Yachioui M.E.L., Berny E., et Ouhssine M., 2009.Etude physico-chimique et microbiologique des laits de vache crus , *Bull.Soc.Pharm.Bordeaux .*(148) : 7-16.

Laithier.C. Les fromages du terroir et microflore du lait cru. Ouvrage collectif de l'institut d'élevage 149 rue de Bercy 75595 Paris, Juillet 2011. 131p

Larpent J.P., 1997. Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier.* Paris. 10-72.

Leclercq-Perlat M. N., Buono F., Lambert D., Spinnler H. E. and Corrieu G. 2004.Controlled Production of Camembert-Type Cheeses: Part I. Microbiological and physico-chemical evolutions. *Journal of Dairy Research* 71(3): 346-354.

Leclercq-Perlat M.N., 2011. Cheese: Camembert, Brie and related varieties.In Editor-in-chief: John .WF, editor .Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition).San Diego: Academic Press pp 773-782.

Leclercq-Perlat M. N., Picque D., Riahi H. and Corrieu G. 2006. Microbiological and Biochemical Aspects of Camembert-Type Cheeses Depend on Atmospheric Composition in the Ripening Chamber. *Journal of Dairy Science* 89(8): 3260-3273.

Lefrileux Y., Picque D., Mirade P.S, Gauzere Y., Leclercq-Perlat M.N.,Guillemin H., Saint-Eve A., Auberger J.M., 2016.Expérimentations sur l'affinage de fromages lactiques fermiers au lait de chèvre.Action 2 du projet "qualité des fromages fermiers lactiques locaux et maîtrise de l'affinage:Rapport de fin d'étude collection résultats de l'institut d'élevage .En cours de publication.

Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry, *Trends Food Sci. Technol.* 15 : 67-78

Leveau J.Y. et Bouix M. 1993. Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Technique et documentation. Lavoisier Paris, pp 170-331.

Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.

Lortal S. and Chapot-Chartier M.-P. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15(6-9): 857-871.

Luquet F.M et Corrieu G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Edit. Tech. Doc. Lavoisier (Paris). P.343-408.

Madingo M. et Martinko J., 2004. Biologie des micro-organismes. Onzième édition Pearson Education France.

Magnusson J. et Schnurer J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., Initiation à la technologie fromagère. 5^{ème} Edition TEC et DOC LAVOISIER, 2011. 194 p

Makarova K., Grishin N., Shabalina S., Wolf Y. and Koonin E., 2006. A putative RNA-interference based immune system in prokaryotes. *Biology direct* J. 1693-1702

Mallet A., Gueguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboue A., Desmasures N., 2012. Quantitative and qualitative microbial analyses of raw milk reveals substantial diversity influenced by management practices. *Int. Dairy Journal* (2012), 13-21

Masoud W. and Jakobsen M. 2003. Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *International Dairy Journal* 13(2-3): 231-237.

Meribai A., Jenidi R., Hammouche Y., Bensoltane A., 2017. Caractérisation physico-chimique et qualité microbiologique du *klila* : un fromage traditionnel sec des régions arides d'Algérie : Etude préliminaire. *Journal of new sciences*. Vol(40)4

Monnet C., Landaud S., Bonnarme P., Swennen D., 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 362 (2015), 1-9, doi : 10.1093/Fems/Fnu 025

Monnet V., Latrille E., Beal C. et Corrieu G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 512-592.

Montel M.C., Beuvier E., Hauwuy A., 2003 Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers

Montel M.C , Bonnemaire J., Béranger C,2005 Les fermentations au service des produits du terroir. Edition INRA 312p

Montel M.C, Bouton Y, Parguel P., 2012 .Ecosystèmes des laits et des fromages au lait cru : enjeux pour leur maîtrise .URF INRA 545 F -15000 Aurillac.Renc.Rech .Ruminants, 2012

Montel M.C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D., Desmasures N., BerthierF., 2014 . Traditional cheeses : Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int.J.of food microbiology 177 (2014) :136-154.

Mounier J , Rea MC , O'Connor PM, Fitzgerald GF , Cogan TM , 2007.Growth characteristics of *Brevibacterium* , *Corynebacterium* , *Microbacterium* , and *Staphylococcus* spp .isolated from surface-ripened cheese.Appl.Environ.Microbiol 73 : 7732-7739.

Mozzi F., Raya R.R et Vignolo G.M., 2010.Biotechnology of lactic acid bacteria. Edit.Wiley-Blackwell.P.361.

Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saihi A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms:The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126** : 286-290.

Ouwehand A.C. et Vesterlund S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria.In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375–395.

Oyetayo V.O., Adetuyi F.C. et Akinyosoye F.A. 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *Afr. J. Biotech.* 2: 448-452.

Parente E., Ricciardi A. et Addario G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 388-394.

Piard J.C. et Desmazeand M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). *2e Ed., Economica.* Paris. 219-240.

Pritchard G.G et Coolbear T.,1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria,FEMS Microbiol.Rev12,197-206.

Profession fromager.2014.Mieux gérer l'affinage des pâtes lactiques ,des pâtes molles et des pâtes pressées non cuites .Profession fromager .Journées technique du 17 juin 2014.Diaporama.165 diapositives.

Quigley L. ,O'Sullivan O., Beresford T.P.,P Ross R., Fitzgerald G.F., Cotter P.D.,2011. Molecular approaches to analysis the microbial composition of raw milk and raw milk cheese, *International journal of food and microbiology*,150 (2-3) ,(2011), 81-94

Ramet J ,2009. L'égouttage du coagulum .In :Eck A ,Gillis JC , editors .Le fromage . 3rd ed.Paris, France : Lavoisier Tec et Doc .pp.42-61.

Raynaud S., Morge S., Pétrier M., Allut G., Barral J., Enjalbert V., Reynaud C., Michel A., 2016. Caractérisation des conduites d'affinage à la ferme et étude des liens avec les paramètres d'ambiance des locaux et la qualité des fromages .Action 1 du projet qualité des fromages lactiques fermiers locaux et maîtrise de l'affinage. Rapport de fin d'étude collection résultats de l'institut d'élevage .En cours de publication

Reats D., Offek M., Minoz D., Halpern M., 2011. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics, *Food Microb.* 28-3, (2011), 465-471

Rijnen L, Yvon M, Van Kranenburg R, Courtin P, Verheul A, et al. 2003 . Lactococcal aminotransférases AraT and BeaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese .*Int Dairy J* 13 : 805-812.

Roissard et Luquet. 1985. Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitiers, *Tec et Doc*, édition Lavoisier, Paris, p362-400-402.

Rulf V., Tourdot-Marechal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 271-447.

Salminen H., Varmola M., Timonen M., 2004. Thinning response and growth trends of seeded scots pine stands at the arctic timberline. *Silva Fennica Review* 38 .71-83p

Samarzija D., Autunac. N et Havranek J.L, 2001. Taxonomy , physiology and growth of *Lactococcus lactis*. *MIjekarstvo* 51.35-48.

Savijokie K., Ingmer H. et Varmanen P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 : 394-406.

Singleton P., 2002 . Bactériologie ,Dunod ,Paris ,pp :381-394.

Sousa MJ , Ardo Y, McSweeney PLH ,2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J* 11 :327-345.

St-Gelais D, Tirard-Collet P ,2002. Chapitre 6 :Fromage ; Vignola C, editor. Montréal :Presses internationales polytechnique.600p.

Stiles M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* 70: 33 1-345.

Tadesse.G., Ephraim.E. et Ashenafi.M., 2004 .Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita ,traditional Ethiopian fermented beverages , on some food borne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity .*Int.J.Food Safety .* 5: 13-20

Tailliez P.,2001.Les bactéries lactiques , ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Mini-revue.Lait* 81.1-11 .

Tamime A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. *In: Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., *John Wiley and Sons, Inc.*, New York. 261-366.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. **1** : 239-290.

Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996. Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from *Growol*. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* **3(2)** : 29-34.

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. et Martin L., 2003. Introduction à la microbiologie . Ed .Renouveau pédagogique inc (Québec).P921.

Upadhyay VK, McSweeney PLH, Magboul AAA, Fox PF, 2004 . Proteolysis in cheese during ripening In : Fox PF, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP, editors, Cheese : Chemistry , Physics and Microbiology : Academic Press.pp.391-433.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., Kersters K. et Swings J., 1996. Polyphasictaxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60** : 407.

Verdier-Metz I., Michel V., Delbès C., Montel M.C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk ? *Food Microbiology* **26(3)**, 305-310.

Veuillemand .J.C.,1986. Microbiologie des aliments.Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec et Doc. Lavoisier.Paris .3 : 1-65

Walling E.G., Indreau E. et Lonvaud-Funel A., 2001. La biosynthèse d'exopolysaccharides par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. *INRA*. 289-300.

Wegmann A., Michael L.,2007. Divergence with genetic exchange .Department of genetics . University of Georgia Athens.Oxford university press.243p

Yvon M, Rijnen L. ,2001. Cheese flavor formation by amino acids catabolism .*Int Dairy J* **11**: 185-201.

Zirnstein G. et Hutkins R., 2000. Streptococcus : Streptococcus thermophilus In Encyclopedic food microbiology. Edited by R.K Robinson, C.A. Batt et P.D Patel. London: Academic press

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture, réactifs et coloration de Gram

Milieu MRS (pH 6,5)

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0.5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

Milieu M17

Tryptone.....	2,50 g
Peptone pepsique de viande	2,50 g
Peptone papaïnique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g
Lactose	5,00 g
Glycérophosphate de sodium	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar bactériologique.....	15,00 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

Milieu du profil fermentaire « Gibson-Abdelmalek » (pH 6,5)

Extrait de levure	2.5g
Glucose	50g
Jus de tomate	100ml
Lait	800ml
Gélose nutritive ordinaire	200ml

Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à 100°C.

Bouillon hypersalé (pH 7,2)

Extrait de viande	5g
-------------------------	----

Glucose 5g
 Peptone 15g
 NaCl 40/65g
 Eau distillée qsp 1000ml
 Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Gélose semi-solide au lait citraté

Lait écrémé à 10% 10.5ml
 Citrate de sodium..... 0.5ml
 Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à 100°C.

Gélose hypersaccharosée (pH 6,8)

Extrait de viande 10g
 Extrait de levure 3g
 Peptone 2.5g
 Saccharose 150g
 K₂HPO₄ 2g
 NaCl 1g
 MgSO₄, 7H₂O 0.2g
 Agar 15g
 Eau distillée qsp 1000ml
 Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Gélose aux triglycérides (pH 6,5)

Peptone 5g
 Extrait de levure 3g
 Triglycérides 10ml
 Agar 15g
 Stérilisation à 110°C pendant 5min.

Gélose Agar au lait : Il se compose d'un mélange de deux milieux

Milieu A : pour un litre

Agar 3%
 Extrait de levure 1%
 Autoclaver à 121°C pendant 15min.

Milieu B : pour un litre

Lait écrémé 6%
 Pourpre de Bromocrésol 0.006%

Stérilisation par tyndallisation 3 fois à 100°C

Mélange A/B : Agar 1.5%, extrait de levure 0.5%, lait écrémé 3.0%, pourpre de Bromocrésol 0.003%.

Milieu PCA-Lait : en grammes pour un litre d'eau distillée

Peptone caséine.....5,00
 Extrait de levure2,50
 Glucose.....1,00
 Lait écrémé.....2,50
 pH final à 25°C : 7,00 ±0,2

Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;

Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;

Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;

Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;

Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;

Laver à l'eau ;

Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Composition du kit d'extraction d'ADN

Kit d'extraction d'ADN oCheck	Préparation en colonne unitaire réf :515040
Tampon L1	20 ml
Tampon L2	12 ml
Réactif L3	3ml
Tampon W1	30 ml
Tampon W2 (concentré)	14 ml
Tampon E	15 ml
Protéine K (lyophilisé)	30 mg
Tampon de protéinase PKB	1,8 ml
ARN porteur (lyophilisé)	0,3 mg
Colonnes	50
Tubes collecteurs	250

Les tampons de lyse et solutions nécessaires à l'extraction d'ADN

TES (pH 8.0)

50 mM tris-base

1 mM EDTA

6.7% saccharose

Filtrer et conserver à température ambiante

STET (pH 8.0)

50 mM Tris-base

50 mM EDTA

8% saccharose

5% Triton-X-100

Filtrer et conserver à température ambiante

Tampon TE :

1mM EDTA

10 mM Tris-Hcl

Autoclaver et conserver à 4 °C

EDTA (0.5 M ; pH 8.0) :

Dissoudre 93.06 g EDTA dans 400 ml d'eau pure, ajouter 15-20 g NaOH pour avoir un pH 8.0 et ajuster avec l'eau pure à 500 ml. Autoclaver, réajuster le niveau avec eau pure stérile et conserver à 4 °C

Tris-HCL :

Dissoudre 31.5 g de tris dans 180 ml d'eau pure, ajouter HCL concentré pour avoir un pH de 8.0 et ajuster le volume à 200 ml avec l'eau pure. Autoclaver, réajuster le niveau avec l'eau pure stérile et conserver à 4 °C

SDS 20% dans TE :

10 g SDS 111

40 ml de tampon TE (10 mM, pH 8.0)

Lysozyme (Amresco, Ohio, USA) : Pour chaque échantillon, dissoudre 5 mg de lysozyme dans 150 µl de TE.

Mutanolysine (Sigma ALDRICH, Steinheim, Allemagne):

Dissoudre dans de l'eau pure à une concentration de 5000 U.ml⁻¹

Ribonucléase (Sigma ALDRICH, Steinheim, Allemagne):

Dissoudre dans de l'eau pure à une concentration de 10 mg.ml⁻¹

NaCl 5M :

Dissoudre 29.22 g dans 100 ml d'eau pure.

50X TAE : 242 g Tris-base

57.1 ml acide acétique glacial

18.61 g Na₂ EDTA

Autoclaver, réajuster le niveau avec de l'eau pure et conserver à 4 °C

Annexe II : Appareillage expérimental utilisé

- Agitateur électrique (Stuart) ;
- Autoclave (Getinge) ;
- Bain Marie (Mettler) ;
- Balance (Sartorius) ;
- Balance analytique (Sartorius) ;
- Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- Compteur de colonies (Selecta colony counter) ;
- Etuves (Mettler) ;
- Four Pasteur (Mettler) ;
- Micropipettes (Thermo) ;
- Microscope optique (Micros Austria) ;
- pH mètre (Hanna) : (sonde pour fromage et sonde pour solution) ;
- Réfrigérateur (LG) ;
- Vortex électrique (MS2 Minishaker) ;
- Ensemenceur spiral (Spiral plater)
- Hotte de manipulation (Biomedis Esco classII)
- Broyeur stomacher (Seward 400C)
- Lactoscan SLP (Milkotronic LTD)

Annexe III

Tableau 28 : Fiche d'analyse sensorielle comparative des fromages

Examen	Nom du produit	Points à examiner	Vocabulaire
1/ Visuel		Etat de la surface	Surface : lisse, plissée, sèche, humide Etat : fine, épaisse Couleur : blanche, crème, jaune
		Pâte	Elasticité : Souple, ferme, cassante Homogénéité : homogène, crevasse
		Arômes	Lactique : lait frais, naturel, Autres : diacétyl, fermenté, synthétique
2/ Olfactif		Intensité	Forte, fade, typée, piquante
3/ Gustatif		Saveurs	Description de la saveur : Sucrée, acide, salée, amer Description des sensations : Douceur, piquant, crémeux, fondant, onctueux Description de la finale bouche : Agréable, très typique, riche en arôme, intense, persistante, plutôt courte

Annexe IV

Appellation d'origine contrôlée et d'origine protégée (INAO France ,2009)

En Normandie, on trouve, à ce jour, **4 fromages** possédant l'Appellation d'Origine Contrôlée. Elle permet de préserver un **patrimoine culturel et gastronomique**. C'est l'assurance qu'un produit a été fabriqué selon un savoir-faire transmis de génération en génération et transcrit dans un **cahier des charges précis**.

L'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) est délivrée par l'INAO (Institut National des Appellations d'Origine) et est un label français.

Depuis le 1er mai 2009, tous les produits bénéficiant du logo AOC et qui ont rejoint la famille des appellations d'origines délivrées par l'Union Européenne doivent impérativement mentionner sur leurs emballages le logo d'Appellation d'Origine Protégée (**AOP**).

Livarot

Au lait de Vache



Pont l'Evêque

Au lait de Vache



Neufchâtel

Au lait de Vache



Camembert de Normandie

Au lait de Vache (Cru)



NORME CODEX POUR LE CAMEMBERT

Précédemment CODEX STAN C-33-1973. Adopté en 1973. Révision 2007. Amendé en 2008, 2010.

1. CHAMP D'APPLICATION

La présente norme s'applique au Camembert destiné à la consommation directe ou à un traitement ultérieur conformément à la description figurant à la Section 2 de la présente norme.

2. DESCRIPTION

Le Camembert est un fromage à pâte molle, affiné en surface, principalement par des moisissures, conformément à la *Norme générale pour le fromage* (CODEX STAN 283-1978), qui se présente sous la forme d'un cylindre plat ou de morceaux dudit cylindre. La pâte a une couleur allant du blanc cassé au jaune pâle et une texture molle (lorsqu'on appuie dessus avec le pouce) mais non friable, affinée de la surface au centre du fromage. Les trous de gaz sont généralement absents, mais la présence de quelques ouvertures et fissures est acceptable. Une croûte molle, entièrement recouverte de moisissures blanches mais présentant parfois des taches de couleur rouge, brunâtre ou orange, se développe. Le fromage entier peut être coupé ou formé en morceaux avant ou après le développement des moisissures.

Pour le Camembert prêt à la consommation, la procédure d'affinage destinée à développer les caractéristiques de goût et de texture dure normalement 10 jours minimum à une température comprise entre 10 à 16 °C, en fonction du degré de maturité requis. D'autres conditions d'affinage (y compris l'ajout d'enzymes d'amélioration de l'affinage) peuvent être utilisées, pour autant que le fromage présente des propriétés physiques, biochimiques et sensorielles similaires à celles obtenues par la procédure d'affinage précitée. Il n'est pas nécessaire que le Camembert destiné à un traitement ultérieur possède le même degré d'affinage lorsque cela est justifié par des besoins techniques et/ou commerciaux.

Le Carré de Camembert est un fromage à pâte molle affiné en surface de forme carrée, qui satisfait à tous les autres critères et exigences spécifiques au Camembert.

3. FACTEURS ESSENTIELS DE QUALITÉ ET DE COMPOSITION

3.1 Matières premières

Lait de vache ou de bufflonne, ou leurs mélanges, et produits obtenus à partir de ces laits.

3.2 Ingrédients autorisés

Cultures de départ de bactéries lactiques inoffensives et/ou bactéries productrices d'arômes, et cultures d'autres micro-organismes inoffensifs, y compris: *Geotrichum candidum*, *Brevibacterium linens*, et les levures;

Présure ou autres enzymes coagulantes inoffensives appropriées;

Chlorure de sodium et chlorure de potassium en tant que succédanés du sel;

Eau potable;

Enzymes inoffensives et appropriées pour l'amélioration du processus d'affinage;

Adjuvants de fabrication inoffensifs et appropriés;

Farines et amidons de riz, maïs et pomme de terre: nonobstant les dispositions de la *Norme générale pour le fromage* (CODEX STAN 283-1978), ces substances peuvent être utilisées pour la même fonction que les antiagglomérants pour le traitement de la surface des produits coupés, en tranches et râpés uniquement, pour autant qu'elles ne soient ajoutées que dans les quantités fonctionnellement nécessaires comme prévu par les bonnes pratiques de fabrication, compte tenu de toute utilisation des antiagglomérants énumérés à la Section 4.

3.3 Composition

Constituant laitier	Teneur minimale	Teneur maximale	Niveau de référence
Matière grasse laitière dans l'extrait sec	30%	Sans restriction Teneur en matière grasse dans l'extrait sec	45% à 55% Teneur en matière sèche minimum correspondante
		Égale ou supérieure à 30 % mais inférieure à 40 %: Égale ou supérieure à 40 % mais inférieure à 45 %: Égale ou supérieure à 45 % mais inférieure à 55 %: Égale ou supérieure à 55 %:	38% 41% 43% 48%

Les modifications en matière de composition dépassant les minima et les maxima spécifiés ci-dessus pour la matière grasse laitière et la matière sèche ne sont pas considérées comme étant conformes à la Section 4.3.3 de la *Norme générale pour l'utilisation des termes de laiterie* (CODEX STAN 206-1999).

3.4 Principales caractéristiques de taille et de forme

Hauteur maximale: environ 5 cm;

Poids: Cylindre plat entier (Camembert)

ou carré (Carré de Camembert): environ 80 g à 500 g.

3.5 Procédure d'affinage essentielle

La formation de croûte et la maturation (protéolyse) de la surface vers le centre sont essentiellement causées par le *Penicillium candidum* et/ou le *Penicillium camembertii* et le *Penicillium caseicolum*.

4. ADDITIFS ALIMENTAIRES

Seules les catégories d'additifs dont l'utilisation est justifiée selon le tableau ci-dessous peuvent être utilisées pour les catégories de produits spécifiées. Pour chaque catégorie d'additif autorisée par le tableau ci-dessous, seuls les additifs alimentaires mentionnés ci-après peuvent être utilisés et ce, uniquement pour les fonctions et dans les limites fixées.

Catégorie fonctionnelle d'additif	Masse du fromage	Traitement de la surface/croûte
Colorants	X a	—
Agents Blanchissants	—	—
Régulateurs d'acidité	X	—
Stabilisants	—	—
Epaississants	—	—
Emulsifiants	—	—
Anti-oxydants	—	—
Conservateurs	—	—
Agents moussants	—	—
Anti-agglomérants	—	—

(a) Uniquement pour obtenir les caractéristiques de couleur décrites à la Section 2.

X l'utilisation de cette catégorie d'additifs est justifiée d'un point de vue technologique

— l'utilisation de cette catégorie d'additifs n'est pas justifiée d'un point de vue technologique

NoSIN	Nom de l'additif	Concentration maximale
Colorants		
160a(i)	Béta-carotène, synthétique	
160a(iii)	Béta-carotène, <i>Blakeslea trispora</i>	35 mg/kg
160f	Béta-apo-8'-caroténal	Seul ou en combinaison
160f	Acide béta-apo-8'-caroténique, ester méthylique ou éthylique	
160a(ii)	Béta-carotène, légume	600 mg/kg
160b(ii)	Extraits de rocou – base de norbixine	25 mg/kg
Régulateurs de l'acidité		
575	Glucono-delta-lactone	Limitée par les BPF

5. CONTAMINANTS

Les produits visés par les dispositions de la présente norme doivent être conformes aux limites maximales de contaminants prescrites pour ces produits dans la *Norme générale pour les contaminants et les toxines présents dans les produits de consommation humaine et animale* (CODEX STAN 193-1995).

Le lait utilisé pour la fabrication des produits visés par les dispositions de la présente norme doit être conforme aux limites maximales de contaminants et de toxines prescrites pour le lait dans la *Norme générale pour les contaminants et les toxines présents dans les produits de consommation humaine et animale* (CODEX STAN 193-1995) ainsi qu'aux limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires ou de pesticides prescrites pour le lait par le CAC.

6. HYGIÈNE

Il est recommandé que les produits visés par les dispositions de la présente norme soient préparés et manipulés conformément aux sections appropriées du *Principes généraux d'hygiène alimentaire* (CAC/RCP 1-1969), du *Code d'usages en matière d'hygiène pour le lait et les produits laitiers* (CAC/RCP 57-2004) et aux autres textes pertinents du Codex, tels que les Codes d'usages en matière d'hygiène et les Codes d'usages. Les produits doivent satisfaire à tout critère microbiologique établi conformément aux *Principes régissant l'établissement et l'application de critères microbiologiques pour les denrées alimentaires* (CAC/GL 21-1997).

7. ÉTIQUETAGE

Outre les dispositions de la *Norme générale pour l'étiquetage des denrées alimentaires préemballées* (CODEX STAN 1-1985) et la *Norme générale pour l'utilisation des termes de laiterie* (CODEX STAN 206-1999), les dispositions spécifiques suivantes s'appliquent:

7.1 Nom du produit

Les noms Camembert et Carré de Camembert peuvent être utilisés conformément à la Section 4.1 de la *Norme générale pour l'étiquetage des denrées alimentaires préemballées* (CODEX STAN 1-1985), pour autant que le produit soit conforme à cette norme. Une orthographe différente peut être utilisée dans le pays de vente au détail lorsqu'elle est de règle dans ce pays.

Le terme «Carré de» peut être remplacé par un autre terme/d'autres termes relatif(s) à la forme et approprié(s) pour le pays de vente au détail.

L'utilisation de ces noms est une option qui ne peut être exercée que si le fromage est conforme à la présente norme. L'abandon de cette option pour un fromage se conformant à cette norme entraîne l'application des dispositions d'appellation de la *Norme générale pour le fromage* (CODEX STAN 283-1978).

La désignation des produits dont la teneur en matière grasse est inférieure ou dépasse les limites du niveau de référence tout en étant supérieure au minimum absolu spécifié à la Section 3.3 de la présente norme s'accompagnera d'une qualification appropriée décrivant la modification opérée ou la teneur en matière grasse (exprimée sous forme de matière grasse dans l'extrait sec ou de pourcentage de la masse, selon ce qui est jugé acceptable dans le pays de vente au détail), soit en faisant partie du nom, soit dans une position évidente dans le même champ de vision. Les qualificatifs acceptables sont les expressions caractérisantes appropriées spécifiées à la Section 7.3 de la *Norme générale pour le fromage* (CODEX STAN 283-1978) ou une allégation nutritionnelle conforme aux *Directives pour l'utilisation des allégations nutritionnelles* (CAC/GL 23-1997)¹.

La désignation peut également être appliquée aux produits coupés, en tranches, râpés ou finement râpés, fabriqués à partir d'un fromage en conformité avec la présente norme.

7.2 Pays d'origine

Le pays d'origine (c'est-à-dire le pays de fabrication, et non le pays dont le nom est originaire) doit être déclaré. Si le produit subit une transformation substantielle² dans un deuxième pays, ce dernier sera considéré comme étant le pays d'origine pour l'étiquetage.

7.3 Déclaration de la teneur en matière grasse laitière

La teneur en matière grasse laitière doit être déclarée d'une manière jugée acceptable dans le pays de vente au détail, soit (i) en pourcentage de la masse, (ii) en pourcentage de matière grasse dans l'extrait sec, soit (iii) en grammes par portion tels qu'ils figurent sur l'étiquette, à condition que le nombre de portions soit indiqué.

7.4 Étiquetage des récipients non destinés à la vente au détail

Les informations données à la Section 7 de la présente norme et aux Sections 4.1 à 4.8 de la *Norme générale pour l'étiquetage des denrées alimentaires préemballées* (CODEX STAN 1-1985) et, au besoin, les instructions de stockage, doivent être indiquées soit sur le récipient, soit sur les documents d'accompagnement, exception faite du nom du produit, de l'identification du lot et des nom et adresse du fabricant ou de l'emballer qui doivent figurer sur le récipient, et en l'absence d'un tel récipient,

sur le produit lui-même. Toutefois, l'identification du lot et le nom et l'adresse du fabricant ou de l'emballer peuvent être remplacés par une marque d'identification, à condition que cette dernière puisse être clairement identifiée à l'aide des documents d'accompagnement.

8. MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET D'ANALYSE

Voir CODEX STAN 234-1999.

APPENDICE-INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Les informations complémentaires ci-dessous ne modifient en rien les dispositions des sections précédentes, qui sont essentielles pour l'identité du produit, l'utilisation du nom de l'aliment et la sécurité sanitaire de l'aliment.

1. Méthode de fabrication

1.1 Procédure de fermentation: développement d'acides dérivés microbiologiquement.

1.2 Type de coagulation: La coagulation de la protéine du lait s'obtient généralement par

l'action combinée de l'acidification microbienne et de protéases (par ex. présure) à une température de coagulation appropriée.



CERTIFICAT D'EXCELLENCE



L'Association de Défense et de Gestion de l'AOC Camembert de Normandie

est fière de reconnaître la participation de M DAHOUC Abdelkader ElAmine aux actions de défense et de protection du nom, du Camembert et à la promotion et à la valorisation des Fromages du terroir

M DAHOUC Abdelkader ElAmine

Chercheur du laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem ALGERIE

PRESIDENT DE L'ASSOCIATION

Neuschâtel-en-Bray, le 17 septembre 2017



Monsieur Thierry GRANDDORGE

Annexe VI

Liste des communications et des publications

Participation aux rencontres scientifiques et valorisation des résultats obtenus :

Participation à un séminaire international des biotechnologies université des frères Mentouri Constantine du 19 au 21/10/2015 avec une communication orale

Participation à une journée internationale des sciences de l'agriculture ,environnement et santé à l'université de Tlemcen le 15/04/2015 avec une communication affichée

Participation à trois journées scientifiques

A l'association pôle agro-alimentaire intégré filière lait Sétif « transferts technologiques pour le développement de la filière lait avec une communication orale le 08/12/2015

A la 6^{ème} journée scientifique de la faculté des sciences de la nature et de la vie les 27 et 28/04/2016 à l'université de Mostaganem avec une communication affichée

A la journée technique Condichim groupe Lallemand cultures speciality avec une communication orale avec une communication orale « recommandations techniques sur l'utilisation des cultures d'affinage des fromages » le 10/10/2016

A la 7^{ème} journée scientifique de la faculté des sciences de la nature et de la vie les 26 et 27/04/2017 à l'université de Mostaganem avec une communication orale

Publications

1/ Journal Afrique science

Afrique SCIENCE 11(6) (2015) 1 - 13 1 ISSN 1813-548X, <http://www.afriquescience.info>

La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien « type j'ben » : connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages

A. DAHOU *, A. HOMRANI , F. BENSALAH et M. MEDJAHED

2/ Journal Afrique science

Afrique SCIENCE 12(6) (2016) 14 - 22 14 ISSN 1813-548X, <http://www.afriquescience.info>

Caractérisation phénotypique et génotypique de deux Lactobacillus isolés d'un fromage traditionnel frais type J'ben

DAHOU *, A. HOMRANI , F. BENSALAH , A. BEKADA et N. MEGHOUFEL

3/ Article en cours de publication : ADVANCES IN BIORESEARCH. Vol. 8 [6] 2017.

Effect of processing technology on the biodiversity of the bacterial flora of an industrial cheese camembert soft type

***Dahou Abdelkader Elamine*⁽¹⁾ *Bekada Ahmed Mohammed Ali*⁽²⁾ *Homrani Abdelkader*⁽¹⁾ , *Latreche Bilel*⁽³⁾ and *Ait Saada Djamel*⁽⁴⁾**

⁽¹⁾ Science laboratory and Techniques Animal Production ,University Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem-Algeria.

⁽²⁾ University center Ahmed Benyahia E Wancharissi of Tissemsilt Algeria.

⁽³⁾ Laboratory for research in biotechnology and quality of foods. University Mentouri brothers Constantine Algeria.

⁽⁴⁾ Laboratory of food technology and nutrition, University Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algeria

Advances in Bioresearch

[A Bimonthly Peer Reviewed ISI Indexed International Journal of Life Sciences]

CODEN: ABRDC3

Online ISSN 2277-1573 Print ISSN 0976-4585

3/ Edition d'un ouvrage « aux éditions universitaires européennes

Intitulé « Etude de la microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien » Editeur Verlag Berlin Allemagne ISBN : 978-3-639-50324-1 Année 2016 (78 pages)

Advances in BioResearch

[A Bimonthly Peer Reviewed ISI Indexed International Journal of Life Sciences]

CODEN: ABRDC3

Online ISSN 2277-1573 Print ISSN 0976-4585

Impact Factor : 0.971 [UIF, Germany]

GIF : 0.56 [Global Impact Factor, Australia]

ICV 7.20 Poland [2012]. 7.23 [2013],

ICV 2014: 88.72

Standardized Value: 8.21

NLM/PUBMED ID: 101595648

Effect of processing technology on the biodiversity of the bacterial flora of an industrial cheese camembert soft type

Dahou Abdelkader Elamine⁽¹⁾ **Bekada Ahmed Mohammed Ali**⁽²⁾ **Homrani Abdelkader**⁽¹⁾,
Latreche Bilel⁽³⁾ and **Ait Saada Djamel**⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Science laboratory and Techniques Animal Production ,University Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem-Algeria.

⁽²⁾ University center Ahmed Benyahia E Wancharissi of Tissemsilt Algeria.

⁽³⁾ Laboratory for research in biotechnology and quality of foods. University Mentouri brothers Constantine Algeria.

⁽⁴⁾ Laboratory of food technology and nutrition, University Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algeria

E-mail : amine2369@gmail.com

Abstract

Industrial cheese production involves the use of a diversified microbiota composed of a natural endogenous microbial population provided by the milk and the other exogenous by a complementary seeding of ferments selected according to the technology used by the cheese maker. This paper aims to characterize the bacterial microbiota of two kinds of industrial soft cheese of traditional and stabilized type, and their biodiversity during ripening. Identification of the bacterial flora of refining in selective environments, followed by the phenotypic identification of the milk isolates by API galleries. Changes in levels of cultivable populations of each species are controlled by the enumeration of viable cells expressed in cfu/g of cheese. It has been proven that the dominance of bacterial species varies with the time of ripening. All along the refining; 08 species have been identified phenotypically *brevibacterium*, lactic enterococci, *Lactobacillus*, the lactococci, the leuconostocs, the micrococci, the pedicocques and lactic streptococci. We have observed sequential growth of some bacterial groups, compared to others in which the acidifying flora is minor and to halotolerant flora reported by the majority of milk at the end of ripening. The preservation of this bacterial population that guarantees the richness and sensory diversity of the industrial cow's milk cheeses also depends on the period of lactation and the applied processing technology.

Keywords. Microbiota, phenotypic identification, viable cells, sequential growth

Received 28.12.2016 Accepted 05.03.2017

Identified : ID: ABR-F-19093

Agrees to publish in the forthcoming issue of the journal **ADVANCES IN BIORESEARCH**.
Vol. 8 [6] 2017.