

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

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires

Option : biotechnologies alimentaire

Thème

Caractérisation microbiologique et de la protéolyse du
fromage traditionnel algérien '*Bouhezza*' de ferme

Présenté par : M. SAOUDI Zineddine

Devant le jury :

Président : Pr. AGLI A.	Professeur	(INATAA, UMC)
Rapporteur : Pr. ZIDOUNE M.N.	Professeur	(INATAA, UMC)
Examineur : Dr. BOUDJELLAL A.	M.C.A.	(INATAA, UMC)
Examinatrice: Dr. KHARROUB K.	M.C.A.	(INATAA, UMC)
Examinatrice: Dr. BEKHOUCHE F.	M.C.A.	(INATAA, UMC)

Année universitaire : 2011-2012.

Résumé

Bouhezza est un fromage de terroir, connu depuis longtemps dans la région des « *chaouia* » à l'est algérien. Ce travail a pour objectif principal d'apporter une contribution à la caractérisation de *bouhezza* de ferme, au point de vue microbiologique et de la protéolyse de ce fromage.

Nous avons collecté six échantillons de *bouhezza* de fermes des régions rurales de la wilaya d'Oum El Bouaghi. Un dénombrement des principaux groupes microbiens montre que la microflore de *bouhezza* est constituée essentiellement par les bactéries lactiques : lactobacilles et streptocoques lactiques. La flore fongique ne représente qu'une très faible fraction des populations microbiennes et les coliformes fécaux et totaux sont absents. La détection par la méthode système BAX[®] a démontré l'absence des trois pathogènes ; *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157: H7.

Une image globale des communautés bactériennes de *bouhezza* est réalisée par la technique PCR-*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*, et a montré que l'écosystème bactérien n'est pas très riche, avec une dominance principalement de *Lactobacillus plantarum* et de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* dans les six échantillons, et secondairement de *Lactococcus Helveticus* et/ou *Lactococcus acidophilus* et/ou *Lactococcus crispatus*, dans quatre échantillons et *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* dans trois autres.

La protéolyse de *bouhezza* est peu importante, avec un taux de maturation qui varie de 8,49% à 16,23% pour les six échantillons. La séparation électrophorétique de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 par PAGE-Urée permet de détecter différentes bandes représentant la diversité des fragments caséiniques résultants de l'hydrolyse des caséines par les enzymes du lait et/ou de la microflore de *bouhezza*

Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse des fractions solubles à pH 4,6, solubles et insolubles dans l'éthanol à 70%, montrent que seuls les profils chromatographiques de la fraction insoluble dans l'éthanol des six échantillons présentent des similarités importantes. Les pourcentages des acides aminés libres dans les trois fractions sont plus faibles par rapport aux pourcentages des peptides. Le pourcentage des peptides hydrophiles est plus élevé dans les deux fractions solubles (40,1% à 54,5% pour la fraction soluble à pH 4,6 et 45,8% à 52,6% pour la fraction soluble en éthanol). Cependant le pourcentage des peptides hydrophobes est plus élevé dans la fraction insoluble dans l'éthanol (entre 41,5% et 61,8%).

Mots clés : fromage traditionnel, *Bouhezza*, affinage, microbiologie, protéolyse, PCR-TTGE, RP-HPLC, PAGE-Urée.

Abstract

Bouhezza is a traditional cheese known in the area of "chaouia", in the east of Algeria. The aim of this study was to contribute to the characterization of microbiological and proteolysis of *Bouhezza* cheese of farm.

Six samples of *Bouhezza* cheese have been collected in the rural areas in the wilaya of Oum El Bouaghi. A count of the principal microbial groups indicates that the microflora of bouhezza was consists essentially of lactic acid bacteria (lactobacilli and lactic streptococci). Fungal flora represents only a very small fraction of microbial populations, total and fecal coliform are absent. The detection of the three pathogens by BAX[®] system method has demonstrated the absence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in the six samples of *bouhezza*.

A global picture of bacterial communities of *bouhezza* is carried out by the PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis, showed that the bacterial ecosystem is not very rich, with a dominance principally of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in all samples, and secondarily of *Lactococcus helveticus* and/or *Lactococcus acidophilus* and/or *Lactococcus crispatus* in four samples. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* are present in three others.

Proteolysis of *bouhezza* is not very large, with a rate of maturation which varies from 8.49% to 16.23% for the six samples. Electrophoretic separation of the insoluble nitrogen fraction at pH 4.6 by urea-PAGE detects different bands representing the diversity of casein fragments resulting from hydrolysis of casein by enzymes from the milk and/or from microflora of *bouhezza*.

The analyses by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography of the fractions soluble at pH 4.6, soluble and insoluble in 70% of ethanol, show that only the chromatographic profiles of the ethanol insoluble fraction of six samples show similarities. The percentages of free amino acids in the three fractions are smaller compared to the percentages of peptides. The percentage of hydrophilic peptides is higher in both soluble fractions (40.1% to 54.5% for the soluble fraction at pH 4.6 and 45.8% to 52.6% for the soluble fraction of ethanol). However the proportion of hydrophobic peptides is higher in the insoluble fraction in ethanol (between 41.5% and 61.8%).

Keywords: traditional cheese, *Bouhezza*, ripening, microbiology, proteolysis, PCR-TTGE, RP-HPLC, PAGE-Urea.

بوهزة هو جبن تقليدي في منطقة الشاوية في الشرق الجزائري. الهدف من هذا العمل هو الإسهام تمييز بوهزة من الناحية المكر وبيولوجية و انحلال بروتينات هذا الجبن.

في هذا العمل قمنا بجمع ستة عينات من بوهزة من عدة مناطق ريفية بولاية . أظهرت طريقة البكتيري الأساسية, ميكروفلور بوهزة يتكون من البكتيريا اللبنية : المكورات العقدية و العصيات اللبنية. بخصوص الفطريات أنها لا تمثل صغير جدا من .
الغيا الكلي للقولونيات الكلية و البرازية. طريقة BAX[®] system غياب
التالية : *Escherichia coli O157: H7* *Salmonella* *Listeria monocytogenes*.

البكتيرية بوهزة بواسطة تقنية PCR- TTGE (Temporal) أظهرت النظام الإيكولوجي البكتيري ليس , هيمنة *Lactobacillus plantarum* *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* في العينات الستة ثم تأتي *Lactococcus crispatus* / *Lactococcus acidophilus* / *Lactococcus Helveticus* عينات *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* .

الانحلال البروتيني لجبن بوهزة نسبيا ضعيف نسبيا, حيث سجلنا نضوج تتراوح بين 8.49 و 16.23 للعينات الستة. بواسطة الهجرة الكهربائية (PAGE-Urea) البروتيني غير إنزيمات الحليب / ميكروفلور بوهزة. 4.6 بروتينات الكازين الناتجة عن

التحليل الكروماتوغرافي بواسطة ية RP-HPLC للأجزاء البروتينية التي غير الإيثانول 70 تبين أنه التشكيلات (profils) الكروماتوغرافي غير قابلة الإيثانول ست عينات تظهر تشابهات مهمة. النسب المئوية الأمينية النسب المئوية لببتيدات.

النسبة المئوية لببتيدات (40.1 54.5) . الأزوتية 4.6 45.8 52.6 للأجزاء البروتينية التي الإيثانول). (بين 41.5 61.8) . ية الببتيدات الغير محبة للماء غير قابل للذوبان في الإيثانول

: تقليدي علم الأحياء المجهرية، التحلل البروتيني بوهزة , PAGE-Urée PCR-TTGE , RP-HPLC.

Remerciements

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

C'est avec un grand honneur que je remercie mon enseignant et promoteur, Pr. ZIDOUNE M. N. Chef de l'équipe Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) du Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.). Pour m'avoir proposé ce sujet et pour m'avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail, pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur AGLI A. d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur BOUDJELLAL A., Maître de conférences et Directeur de l'I.N.A.T.A.A., d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon travail

Je tiens à remercier Dr. KHAROUB K., Maître de conférences à l'I.N.A.T.A.A., d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon travail. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de mes études.

Je remercie également Dr. BEKHOUCHE F., Maître de conférences à l'I.N.A.T.A.A., de m'avoir fait l'honneur de faire partie des membres du jury et d'examiner ce travail. Je tiens à vous remercier

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à Madame Stefania CARPINO, Directrice de recherche, de m'avoir accueillie au sein de son équipe aux laboratoires 'Consorzio per la Ricerca sulla Filiera Lattiero-Casearia' (CORFILAC) pendant mon séjour en Italie, où j'ai réalisé ce travail.

Je remercie particulièrement Concetta PEDILIGGIERI, technicienne au laboratoire 'Laboratorio di Biologia Molecolare'.

Je n'oublie pas de remercier les personnels du CORFILAC pour leur sympathie et leur aide scientifique, pour leurs encouragements et leur amitié ; je cite en particulier Davide QUASTELLA, Linda MIGLIORISI, Vita Maria MARINO, Stefania MIRABILLA, Stefania LATERRA., Mario MANENTI, Francesca LATERRA, Giovanni MARINO, Ravalí MARIO.

Des remerciements très particuliers sont présentés à Madame Ouarda AISSAOUI ZITOUN et M. MEDJOUJ Hacene de l'équipe Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) pour son aide pour la réalisation de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à ma famille pour son soutien sans faille et pour l'équilibre qu'elle m'apporte, pour ses encouragements.

Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à l'avancement de ce travail, mes enseignants et collègues à l'I.N.A.T.A.A.

SOMMAIRE

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

INTRODUCTION	1
---------------------------	---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Aperçu sur les protéines du lait	3
1-1. Protéines lactosériques.....	3
1-2. Les caséines.....	3
1-3. Micelle de caséine.....	4
2- Principes généraux de la technologie fromagère	5
3- Fromage traditionnel algérien ‘Bouhezza’	6
3-1. Préparation du <i>chekoua</i>	7
3-2. Fabrication de <i>bouhezza</i>	7
4- Affinage des fromages	8
4-1. Biochimie de l’affinage.....	9
4-1-1 Protéolyse et la dégradation des composés protéiques.....	9
4-1-1-1 Principales enzymes protéolytiques.....	10
4-1-1-2 Catabolisme des acides aminés.....	12
4-1-2 Lipolyse et dégradation des composés lipidiques.....	12
4-1-2-1 Agents de lipolyse.....	13
4-1-3 Glycolyse et métabolisme de lactose.....	14
4-2. Microbiologie de l’affinage.....	15
4-2-1 Flore bactérienne associée à l’affinage.....	15
4-2-2. Bactéries lactiques.....	15
4-2-2-1. Bactéries lactiques levains.....	15
4-2-2-2. Bactéries lactiques non levains.....	16
4-2-3. Complexités, biodiversités et interactions de la flore microbienne.....	16
4-2-4. Facteurs de variation de l’affinage.....	18
5- Aperçu sur les méthodes de caractérisation de la protéolyse et de l’écosystème microbien des fromages	20
5-1 Modes d’évaluation de l’activité protéolytique.....	20
5-1-1 Méthodes non spécifiques.....	20
5-1-2 Méthodes spécifiques.....	21
5-1-2-1 Techniques électrophorétiques.....	21
5-1-2-2 Techniques chromatographiques.....	21
5-2 Méthodes de caractérisation de l’écosystème microbien des fromages.....	22
5-2-1 Approche classique.....	22
5-2-2 Approche moléculaire.....	23
5-2-2-1 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	23
5-2-2-2 Méthodes moléculaires culture-indépendante.....	24

MATERIEL ET METHODES

1- Echantillonnage	27
1-1 Origine et période de fabrication des échantillons.....	27
1-2 Diagramme de fabrication.....	27
2- Caractérisation microbiologique	29
2-1- Détection des bactéries pathogènes par le système BAX®	29
2-1-1. Principe.....	29
2-1-2. Détection de <i>Salmonella</i>	29
2-1-3. Détection de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
2-1-4 Détection de l' <i>Escherichia coli O157:H7</i>	31
2-1-5 Expression des résultats.....	31
2-2 Dénombrement des principales flores.....	32
2-2-1 Dénombrement de la flore mésophile totale.....	32
2-2-2 Dénombrement de la flore fongique.....	32
2-2-3 Dénombrement des coliformes totaux.....	32
2-2-4 Dénombrement des coliformes fécaux.....	32
2-2-5 La flore lactique.....	32
2-2-5-1. Dénombrement des Lactobacilles.....	33
2-2-5-2. Dénombrement des Streptocoques lactiques.....	33
2-3 PCR-TTGE (PCR- <i>Temporal Temperature Gel Electrophoresis</i>).....	33
2-3-1 Principe.....	33
2-3-2 Extraction de l'ADN génomique à partir de la masse fromagère.....	33
2-3-3 Amplification de l'ADN génomique.....	34
2-3-4 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	35
2-3-5 Préparation du gel de polyacrylamide et analyse en TTGE (<i>Temporal Temperature Gel Electrophoresis</i>)	35
3- Caractérisations physicochimiques	38
3-1 Détermination du pH et de l'acidité.....	38
3-2 Détermination de la matière sèche.....	38
3-3 Dosage du taux de matière grasse.....	39
3-4 Détermination du taux de chlorures.....	39
3-5 Dosage de l'azote total.....	40
3-6 Dosage de la fraction azotée soluble à pH 4,6.....	41
3-7 Dosage de la fraction azotée soluble à 12 % de TCA.....	41
4- Caractérisation de la protéolyse	41
4-1 Extraction des fractions azotées	41
4-1-1 Extraction des fractions azotées solubles et insoluble à pH 4.6.....	42
4-1-2 Extraction des fractions azotées solubles et insolubles dans 70% d'éthanol.....	43
4-2 Electrophorèse sur gel de polyacrilamide en présence d'urée (PAGE-urée).....	43
4-2-1 Préparation du gel de migration.....	43
4-2-2 Préparation et dépôt des échantillons.....	44
4-2-3 Migration et révélation	44
4-3 Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC)...	45
4-3-1 Principe.....	45

4-3-2 Description du système HPLC.....	46
4-3-3 Préparation des échantillons et des phases mobiles pour la RP-HPLC.....	46
4-3-4 Paramètres d'analyse en HPLC.....	47

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Caractérisations microbiologiques.....	48
1-1 Détection des bactéries pathogènes	48
1-2 Dénombrement des principales flores	49
1-2-1 Flore aérobie mésophile totale	50
1-2-2 Coliformes totaux	51
1-2-3 Coliformes fécaux	51
1-2-4 Lactobacilles	52
1-2-5 Streptocoques lactiques	52
1-2-6 Levures et moisissures	53
1-3 Identification par PCR-TTGE	53
1-3-1. Qualité des amplifiats du PCR	53
1-3-2. Résultats de la PCR-TTGE	54
2- Caractérisations physicochimiques.....	59
2-1 pH et acidité	59
2-2 Matière grasse	60
2-3 Extrait sec total	61
2-4 Taux de NaCl.....	62
2-5 Taux de l'azote total et ses fractions	62
3- Caractérisations de la protéolyse	64
3-1 Electrophorèse de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 sur gel de polyacrilamide en présence d'urée (PAGE-urée)	64
3-2 Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC).....	66
Conclusion.....	74
Références bibliographiques	76
Annexe	

Liste des figures

Figure 1. Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage : (a) protéolyse, (b) lipolyse et (c) métabolisme de lactose, de lactate et de citrate.....	9
Figure 2. Protéolyse des caséines et catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromages.	12
Figure 3. Principales voies cataboliques des acides gras libres dans les fromages.....	14
Figure 4. Plan de différentes possibilités de l'analyse de fromage par les méthodes moléculaires	25
Figure 5. Formation du réseau de polyacrylamide dans un gel P.A.G.E.	36
Figure 6. Fractionnement des matières azotées en vue des analyses par PAGE-Urée et par RP-HPLC.	42
Figure 7. Schéma d'une chaîne HPLC	46
Figure 8. Profils électrophorétiques des fragments de l'ADN bactériens amplifiés et du marqueur de taille sur gel d'agarose à 1,5%.....	54
Figure 9. Courbe du logarithme de la taille des fragments du marqueur en fonction de la distance migrée.	54
Figure 10. Résultats de la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites du <i>bouhezza</i> des fermes.	55
Figure 11. Résultats de la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites du <i>bouhezza</i> au lait de chèvre.....	56
Figure 12. PAGE-Urée des protéines insolubles à pH 4,6 de fromage <i>bouhezza</i> de différentes fermes.	65
Figure 13. Exemples des profils du RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 pour deux types des fromages.	68
Figure 14. Superposition des chromatogrammes de RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 pour les six échantillons de <i>bouhezza</i>	68
Figure 15. Superposition des chromatogrammes de RP-HPLC obtenues de la fraction insoluble dans l'éthanol à 70% pour les six échantillons	70
Figure 16. Superposition des chromatogrammes de RP-HPLC obtenues de la fraction soluble dans l'éthanol à 70%.	72

Liste des tableaux

Tableau 1. Hydrolyse des protéines du lait avec apparition de composés aromatiques et modification de la texture.....	11
Tableau 2. Inventaire des interactions microbiennes en fromages	17
Tableau 3. Origine et période de fabrication des échantillons	27
Tableau 4. Principales étapes du diagramme de fabrication des six échantillons.....	28
Tableau 5. Composition du milieu réactionnel pour PCR (Mix PCR)	34
Tableau 6. Composition des gels de séparation et de concentration	35
Tableau 7. Les souches utilisées comme marqueur pour la PCR-TTGE.....	36
Tableau 8. Les espèces de la base des données.....	37
Tableau 9. Composition des gels de polyacrylamide en milieu urée.....	44
Tableau10. Composition des solutions tampons des gels de concentration et de séparation	44
Tableau 11. Présence ou absence des trois bactéries pathogènes dans <i>bouhezza</i> des fermes.	48
Tableau 12. Dénombrement des principales flores des six échantillons de <i>bouhezza</i> (en UFC/g).	50
Tableau 13. Valeurs des paramètres physico-chimiques pour les six échantillons de <i>bouhezza</i>	59
Tableau 14. Valeurs moyennes des fractions azotées pour les six échantillons.....	62
Tableau 15. Pourcentage des surfaces des trois zones des chromatogrammes de la fraction soluble à pH 4,6 des six échantillons.....	69
Tableau 16. Pourcentage des surfaces de différentes zones des chromatogrammes de la fraction insoluble dans l'éthanol à 70%.	71
Tableau 17. Pourcentage des surfaces de différentes zones des chromatogrammes de la fraction solubles dans l'éthanol à 70%.	72

Liste des abréviations

ADN	Acide D ésoxyribo N ucléique
ANC	Azote n on caséinique
ANP	Azote n on protéique
ARN	Acide R ibo N ucléique
CN	Caséine
Da	D alton
DGGE	D enaturing G radient G el E lectrophoresis
EDTA	Acide E thyl D iamine T etra A cétique
M	M olaire
MGES	pourcentage de la M atière G rasse dans l' E xtrait S ec (teneur en matière grasse du fromage x 100)/poids totale du fromage - poids de l'eau dans le fromage.
mM	m illi M olaire
mV	m illivolt
N	N ormalité
nm	n anomètre
p/v	p oids / v olume
PAGE	E lectrophorèse sur gel de p olyacrylamide
pb	p aire de b ase
PCR	P olymerase C hain R eaction
RP-HPLC	C hromatographie L iquide de H aute P erformance en P hase R everse
rpm	r otation p ar m inute
SDS	(D odécyl S ulfate d e S odium) S odium D odecyl S ulfate
TCA	Acide T richloro A cétique
TEFD	pourcentage de la T eneur E n eau dans le F romage D égraissé, (pois de l'eau dans le fromage) X 100/poids totale de fromage – poids de l'eau dans le fromage.
<i>T_m</i>	T emperature du fusion (M elting T emperature)
TTGE	T emporal T empérature G el E lectrophoresis
UFC	U nité F ormant C olonie
V	V olt
v/v	v olume/ v olume

Introduction

INTRODUCTION

Les aliments traditionnels font partie du patrimoine de chaque peuple et nous rencontrons et vivons des recettes, entourées d'un savoir-faire ancestral transmises de génération en génération. Parmi ces aliments, les fromages traditionnels, dont il existe plus de 1000 variétés produits à l'échelle mondiale (FOX *et al.*, 2000 ; HAYALOGLU *et al.*, 2002 ; IRLINGER et MOUNIER, 2009). La production des fromages artisanaux, surtout ceux à base de lait cru, est fortement liée au terroir, par le biais de la composition du lait tant dans sa composante biochimique que microbiologique (MICHEL *et al.*, 2001). Cette composante microbiennes, qualifiée de naturelle ou indigène permet de préserver la typicité et une certaine diversité sensorielle des fromages (SERHAN, 2008). La caractérisation du fromage, constitue un point de départ d'une démarche dont l'objectif est la conservation et la protection de ses caractéristiques spécifiques (CASALTA *et al.*, 2001), c'est aussi le moyen de mieux comprendre les mécanismes qui déterminent sa typicité et de fournir les références indispensables à la mise en place d'une appellation d'origine contrôlée (CHAMBA *et al.*, 1994).

En Algérie, les fromages traditionnels sont peu nombreux, non entièrement recensés et aussi peu étudiés ; environ dix types de fromage sont connus dans les différentes régions du pays (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a). Parmi ces fromages, on rencontre *bouhezza*, *mechouna* et *madeghissa*, dans la région des *Chaouia*, *takammèrite* et *aoules* dans le sud, *igounanes* dans la région du *Kabylie*. Malheureusement plusieurs d'entre ces fromages sont en voie de disparition, pour différentes raisons dont l'indisponibilité fourragère, l'exode rurale et le changement des habitudes alimentaires. Nous ignorons le devenir de ces produits, mais il convient de faire tout ce qui est possible pour les connaître, maintenir leur existence et encourager leur fabrication. Ces fromages représentent un bien culturel avant d'être une ressource économique, qui doit être bien caractérisée et protégée.

Le fromage *bouhezza* est connu depuis longtemps dans la région des « *Chaouia* » à l'est algérien, une région qui regroupe principalement les wilayas d'Oum El Bouaghi, Batna, Khenchla et Tébessa. Il est fabriqué à partir de laits de chèvre, de brebis, de vache ou de mélange. Son procédé de fabrication particulier est caractérisé par l'utilisation d'une peau d'animaux « *chekoua* » comme contenant de la matière première et séparateur de lactosérum ; s'y produit aussi la coagulation, le salage et l'égouttage en parallèle et en continu. *Bouhezza* est pour l'instant, le seul fromage traditionnel algérien affiné. La fabrication de ce fromage était principalement destinée à l'autoconsommation.

Bouhezza a fait l'objet de quelques premières études scientifique au sein de l'équipe de recherche T.E.P.A. (Transformation et Elaboration des Produits Agro-Alimentaire) du

Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006 ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011b), mais il reste encore beaucoup à faire. Notre étude s'inscrit dans la même démarche, comme une contribution de la caractérisation de *bouhezza* de ferme.

Nous aborderons les aspects suivants

La première partie repose, sur la caractérisation microbiologique du *bouhezza*, et ceci par deux approches : la première, consiste à un dénombrement des principaux groupes microbiens sur des milieux sélectifs et la deuxième visant l'accès à identifier l'écosystème naturel du *bouhezza* de ferme pour prendre une image globale de ses communautés bactériennes à l'aide d'une technique de la biologie moléculaire (TTGE : *Temporal Temperature Gel Electrophoresis*).

En plus la recherche de quelques pathogènes est entreprise en vue de s'assurer de la qualité du produit fini.

La deuxième partie, consiste à caractériser la protéolyse de *bouhezza* de ferme par des techniques, électrophorétique et chromatographique, en plus de la caractérisation physico-chimiques.

De ce fait nous proposons la structure de ce document comme suit :

- une première partie qui est consacrée à une étude bibliographique présentant les protéines du lait, les principes de la fromagerie, l'affinage des fromages et un aperçu sur les méthodes de caractérisation de la protéolyse et de l'écosystème microbien des fromages ;
- une deuxième partie pratique qui décrit la méthodologie, les échantillons et les techniques expérimentales utilisées.
- une troisième partie regroupe les résultats obtenus et leur discussion suivie d'une conclusion du travail.

Synthèse
Bibliographique

1- Aperçu sur les protéines du lait

Du point de vue physico-chimique, le lait peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse contenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous (lactose, sels, vitamines, protéines et composés azotés solubles) et les autres sous la forme colloïdale (micelles de caséines, phosphate de Ca et de Mg) (LUQUET, 1990). Dans cet ensemble des constituants, les protéines, dont la teneur moyenne est estimée à 34 g/l.

Le lait est constitué de deux fractions protéiques principales classées selon leur solubilité à pH 4,6, une fraction soluble et une fraction colloïdale. La fraction soluble se compose des protéines lactosériques et la fraction colloïdale est formée par les caséines, ces fractions représentent respectivement 20% et 80% des protéines du lait (GUILLOU *et al.*, 1986).

1-1. Protéines lactosériques

Les protéines du lactosérum, qui représentent 5-7 g/l (soit 20 % des protéines totales), c'est la fraction protéique qui reste soluble lors d'une précipitation à pH 4,6 et à 20°C des protéines du lait. Elles regroupent différentes entités ayant une bonne valeur nutritionnelle et dotées d'activités biologiques variées dont nous distinguons principalement : la α -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, les immunoglobulines, l'albumine sérique bovine et les protéose-peptones. D'autres protéines et enzymes sont aussi présentes mais à des proportions plus réduites (BRULE *et al.*, 1997).

1-2. Les caséines

Les caséines (CN) sont les protéines majeures du lait. Elles se définissent comme étant la fraction protéique qui précipite à pH 4,6 et à 20°C. Les caséines sont au nombre de quatre : caséine- α_1 , caséine- α_2 , caséine- β et caséine- κ . Ce sont des protéines multiphosphorylées, et la caséine- β pouvant être également glycosylée (FOX *et al.*, 2000). En raison de leur importance commerciale, les caséines ont été étudiées intensivement et sont probablement le meilleur système protéique caractérisé des aliments (FOX et BRODKORB, 2008).

Toutes les caséines sont des phosphoprotéines de 150 à 200 acides aminés, possédant des groupements phosphates unis à la chaîne latérale de la sérine (groupe phosphoséryl) (CAYOT et LORIENT, 1998).

La CN- β bovine contient 209 résidus d'acides aminés et comporte cinq résidus de sérine phosphorylées (BRULE *et al.*, 1997). Elle ne contient pas de résidu de cystéine. Cette protéine possède neuf variantes génétiques (A¹, A², A³, B, C, D, E, F, G) (FARRELL *et al.*, 2004). La présence de certaines variantes génétiques des caséines dans le lait, a un effet significatif sur les propriétés de la fabrication des fromages (FOX *et al.*, 2000).

Le lait bovin contient environ 9,3 g.L⁻¹ de caséine- (RIBADEAU-DUMAS et GRAPPIN, 1989). Celle ci peut être hydrolysée par la plasmine, ce qui génère les fragments 1-28 (PP8f), 1-105/107 (PP5) et 29-105/107 (PP8s) qui sont également appelés protéose-peptones et retrouvés dans le lactosérum. Les fragments complémentaires sont les caséine-₁ [29-209], caséine-₂ [106-209] et caséine-₃ [108-209] qui se retrouvent dans la fraction caséinique car sont insolubles à pH 4,6 (GORDON *et al.*, 1972 ; FOX *et al.*, 2000 ; FARRELL *et al.*, 2004).

La CN-_{s1} bovine est la protéine majeure du lait de vache : elle représente plus de 40% des caséines totales, elle présente huit variantes génétiques (A, B, C, D, E, F, G et H) (NG-KWAI-HANG, 2003), parmi lesquelles le variant B est le plus fréquent, et qui est constitué de 199 résidus d'acides aminés et possède huit résidus toujours phosphorylés, la caséine-_{s1} aurait un rôle de charpente de la micelle (EIGEL *et al.*, 1984).

La CN-_{s2} bovine est la caséine la moins abondante (10% des caséines totales) et la plus sensible au calcium. Elle contient 207 résidus d'acides aminés (FITZGERALD, 1998). La caséine-_{s2} est le composant caséinique le plus phosphorylé avec un degré de phosphorylation variable, allant de 10 à 13 phosphores (SWAISGOOD, 1992).

La CN-_{s3} bovine contient 169 résidus d'acides aminés (MOLLE et LEONIL, 1995), Cette caséine ne se précipite pas en présence de calcium et permet donc de stabiliser la structure micellaire. La caséine-_a a la particularité de posséder des formes glycosylées, car elle présente six sites de O-glycosylation situés dans la partie C-terminale de la protéine (LEONIL *et al.*, 2001 ; CREAMER, 2002).

CN-_{s1} joue le rôle clé dans la coagulation du lait par la présure, par son hydrolyse en deux parties, la partie N-terminale (1-105), légèrement cationique et très hydrophobe, et la partie correspondante au glycomacropéptide (106-169) très hydrophile, donnant un caractère très amphiphile à la protéine. Lors de l'hydrolyse par la présure, la para-caséine (1-105) reste accrochée à la micelle, alors que le glycomacropéptide (106-169) hydrophile est perdu dans le lactosérum. La micelle en perdant son pôle hydrophile stabilisant, elle se précipite (CAYOT et LORIENT, 1998).

1-3. Micelle de caséine

Malgré les variations dans la composition en caséine du lait des différentes espèces, les caséines se présentent sous la forme de micelles. La micelle de caséine est une particule de taille variante de 50 à 600 nm avec un diamètre moyen de 150-180 nm (AMIOT *et al.*, 2002 ; FOX et BRODKORB, 2008).

L'un des rôles de la micelle est de transporter le phosphate et le calcium dans le lait, permettant de maintenir une concentration élevée de calcium fortement assimilable,

elle est formée par l'association des caséines (κ_1 , κ_2 , et α_2), de quelques fragments peptidiques (les caséines- β), et des composants salins. Son poids moléculaire moyen est de l'ordre de 10^8 Da (HORNE, 2006).

2- Principes généraux de la technologie fromagère

Le fromage correspond à un véritable moyen de conservation des principaux composants de lait, dont il existe plus de 1000 variétés produites à l'échelle mondiale (IRLINGER et MOUNIER, 2009), obtenues grâce au jeu croisé de l'élimination plus au moins poussée de l'eau du lait et de la récupération des matières sèches. Selon BRULE *et al.* (1997), la transformation du lait en fromage comporte quatre étapes principales : la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage.

a- La coagulation du lait qui correspond à des modifications physicochimiques des micelles de caséines, entraînent la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel. La coagulation peut être réalisée soit par :

- Protéolyse limitée par l'action des protéinases sélectionnées (presque 70% de la production fromagère);
- Acidification à pH d'environ 4,6 (moins de 30% de la production fromagère);
- Ou par l'acidification en combinaison avec chauffage (pourcentage très faible) (FOX et MCSWEENEY, 2004).

- Coagulation par acidification

L'acidification du lait peut être obtenue, par les produits de fermentation des bactéries acidifiantes ou par des composés chimiques d'action acidifiante directe (généralement par acide lactique ou acide chlorhydrique) ou action indirecte (généralement l'hydrolyse de la gluconolactone) (FOX *et al.*, 2000).

La diminution concomitante du pH a pour effet de faire régresser l'ionisation des fonctions acides des caséines, induisant le déplacement progressif du calcium et du phosphore inorganique de la micelle vers la phase aqueuse. A pH 6,5-5,2 il y a solubilisation du phosphate de calcium et à pH 5,2-4,6 le complexe se dissocie, ce qui induit la désorganisation des micelles et une réorganisation des sous unités micellaires (BRULE *et al.*, 1997).

- Coagulation enzymatique

Un grand nombre des enzymes protéolytiques de différentes origines (animale, végétale et microbienne) ont la propriété de coaguler le lait, mais la plus utilisée est la présure. La coagulation du lait par les protéases se fait en deux étapes distinctes, l'une enzymatique et durant laquelle la protéase attaque la liaison Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ de la caséine- β . Cette coupure conduit à la destruction des propriétés stabilisantes de la caséine- β par la

libération du glycomacropéptide (HORNE, 2002). L'autre non enzymatique, c'est la phase de floculation, qui dépend strictement de Ca^{2+} et du phosphate de calcium colloïdal (FOX, 1982). Durant la phase secondaire, les micelles de caséine se regroupent en présence de Ca^{2+} (BRULE *et al.*, 1997).

b- Egouttage du caillé qui assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum. Ce processus est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécaniques et thermiques, des facteurs indirects (acidification et/ou coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséines, en protéines solubles et en matière grasse) (VEISSEYRE, 1979 ; RAMET, 1987).

c- Salage, dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois, un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau. Cette phase consiste à enrichir la pâte fromagère en chlorure de sodium (VEISSEYRE, 1979 ; ALAIS et LINDER, 1997).

d- Affinage qui se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, ce processus est très complexe, il sera détaillé dans cette partie bibliographique.

3- Fromage traditionnel algérien '*Bouhezza*'

Bouhezza est un fromage traditionnel algérien, sa fabrication est anciennement pratiquée chez les populations *Chaouia*, qui vivent dans la région des Aurès (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE., 2006). La pratique de fabrication de *Bouhezza* s'étale de la région de l'Aurès à Batna jusqu'aux frontières tunisiennes à Tébessa. A cette dernière limite, quelques familles connaissent le fromage *bouhezza* sous le nom de *Malh Dh'ouab* ou *Bou mellal* (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006).

Chaouia est la dénomination donnée aux habitants berbères de l'Aurès. Ces habitants étaient connus par leur activité pastorale et principalement par l'élevage ovin. Le mot '*Chaouia*', qui découle du mot arabe '*El chett ou El chieh*' et qui signifie ovin(s), se réfère à leur élevage des ovins, ces berbères sont localisés définitivement dans les zones montagneuses de l'Aurès et ont délaissé la vie de déplacement (EL CHAFII, 1987, cité par AISSAOUI ZITOUN, 2004).

Bouhezza est un fromage fermier à égouttage spontané et à pâte épicée, préparé à l'origine à partir de lait de chèvre et éventuellement de brebis (ZAIDI, 2002). La fabrication de *bouhezza* nécessite la préparation du contenant de la pâte '*chekoua*' et la préparation du fromage.

3-1. Préparation du *chekoua*

Le mot '*chekoua*' est utilisé pour désigner le contenant du fromage *bouhezza*. La peau non fendue de différents animaux (de chèvre ou de brebis) peut être utilisée pour sa préparation (AISSAOUI ZITOUN, 2004).

'*Chekoua*' se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, elle joue à la fois un rôle d'un contenant de la masse fromagère et d'un séparateur de phase, c'est à travers les perforations naturelles de la peau que le lactosérum est exsudé (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). La peau de chèvre ou de chevreau semble égoutter mieux, elle est plus épaisse, solide et plus résistante aux chocs (BENMESSAI et FETHALLAH, 2009). Avant utilisation de la peau, cette dernière nécessite un traitement approprié, elle est laissée se putréfier à température ambiante, environ 2 à 7 jours pour faciliter l'arrachage des poils ou de la laine. Après un lavage avec de l'eau, la peau est traitée principalement avec le sel et le genièvre avec possibilité d'incorporer d'autres produits (tanins, romarin, semoule, orge,...) (AISSAOUI ZITOUN, 2004). Ensuite, la peau est laissée au repos pendant presque une ou deux semaines pour éliminer l'odeur de putréfaction et la rendre plus solide. Après cette étape la peau doit être retournée, coté poils à l'intérieur et coté chair à l'extérieur, puis elle sera nouée et ficelée pour lui donner la forme de '*chekoua*'.

3-2. Fabrication de *bouhezza*

La préparation du *bouhezza* est habituellement débute de mars à juin (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; BENMESSAI et FETHALLAH, 2009 ; AZIZI et KERTICHE, 2009), et s'étale de plusieurs semaines à quelques mois. Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément durant la période de fabrication (ZAIDI *et al.*, 2000 ; AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a). La consommation du fromage est possible à partir d'un mois de fabrication.

Les laits des différentes races peuvent être utilisés, seuls ou en mélange. L'utilisation du lait de brebis est plus répandue dans les Wilayas de Batna et de Khenchela. A nos jours c'est le lait de vache qui est le plus utilisé car c'est le plus disponible (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; BENMESSAI et FETHALLAH, 2009).

La préparation du fromage se fait par une quantité initiale de lait fermenté spontanément, baratté et écrémé désigné par « *Lben* ». Cette quantité est complétée durant toute la période de fabrication par des ajouts successifs de *Lben* et/ou de lait cru. Le *Lben* de fabrication est de préférence écrémé et peu acide. L'ajustement des différents ajouts se réalise en fonction de la vitesse d'égouttage et de la disponibilité de la matière première. Quelques familles n'utilisent jamais un mélange des différentes races dans la même

fabrication et le *Lben* utilisé est généralement acide et moyennement gras (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; LEMOUCHI, 2007 ; BENMESSAI et FETHALLAH, 2009).

Le salage se fait dans la matière première ou directement dans la pâte fromagère, la quantité ajoutée est très variable d'une famille à une autre [20 à 125 g/l]. Chez toutes les familles la correction du goût salé ou acide se fait par l'ajout de lait cru, après dégustation (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). La *chekoua* doit être suspendue dans un endroit aéré et à l'ombre et bien entretenue au cours de la fabrication par des lavages réguliers à l'aide de l'eau et de raclage de sa surface externe.

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

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

Du point de vue de sa consistance, la pâte du *bouhezza* est peu molle et caractérisée par un goût peu piquant du piment rouge et une acidité assez prononcée. D'après les résultats de AISSAOUI ZITOUN (2004), *bouhezza* retrouve sa place dans la classification du codex alimentaire, c'est un fromage à pâte molle (taux de la Teneur En eau dans le Fromage Dégraissé 'TEFD' de 71,9%), migras (taux de la Matière Grasse dans l'Extrait Sec 'MGES' de 30%), affiné principalement dans la masse.

La microflore de *bouhezza* est constituée en particulier des Lactobacilles et des Lactocoques (10^6 à 10^7 UFC.g⁻¹). D'autres groupes microbiens sont présents, comme les moisissures, les entérobactéries, la flore protéolytique et lipolytique. L'évaluation sensorielle des échantillons épicés permet la distinction de deux grandes familles d'odeur et arômes caractéristiques : lactique et animale (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a).

4- Affinage des fromages

La transformation du lait en fromage fait intervenir deux paramètres principaux dont l'effet stabilisant est complémentaire : un abaissement du pH obtenu par acidification et un abaissement de l'activité de l'eau (a_w), résultant de la concentration de la matière sèche par égouttage, salage et évaporation.

L'affinage correspond à diverses transformations biochimiques des constituants du lait (protéolyse, lipolyse, glycolyse...) (figure 1), qui résultent de l'activité des enzymes natives du lait ou de celles qui sont issues des microorganismes endogènes ou exogènes du

lait en vue de sa transformation en fromage (MCSWEENEY, 2004 ; UPADHYAY *et al.*, 2004).

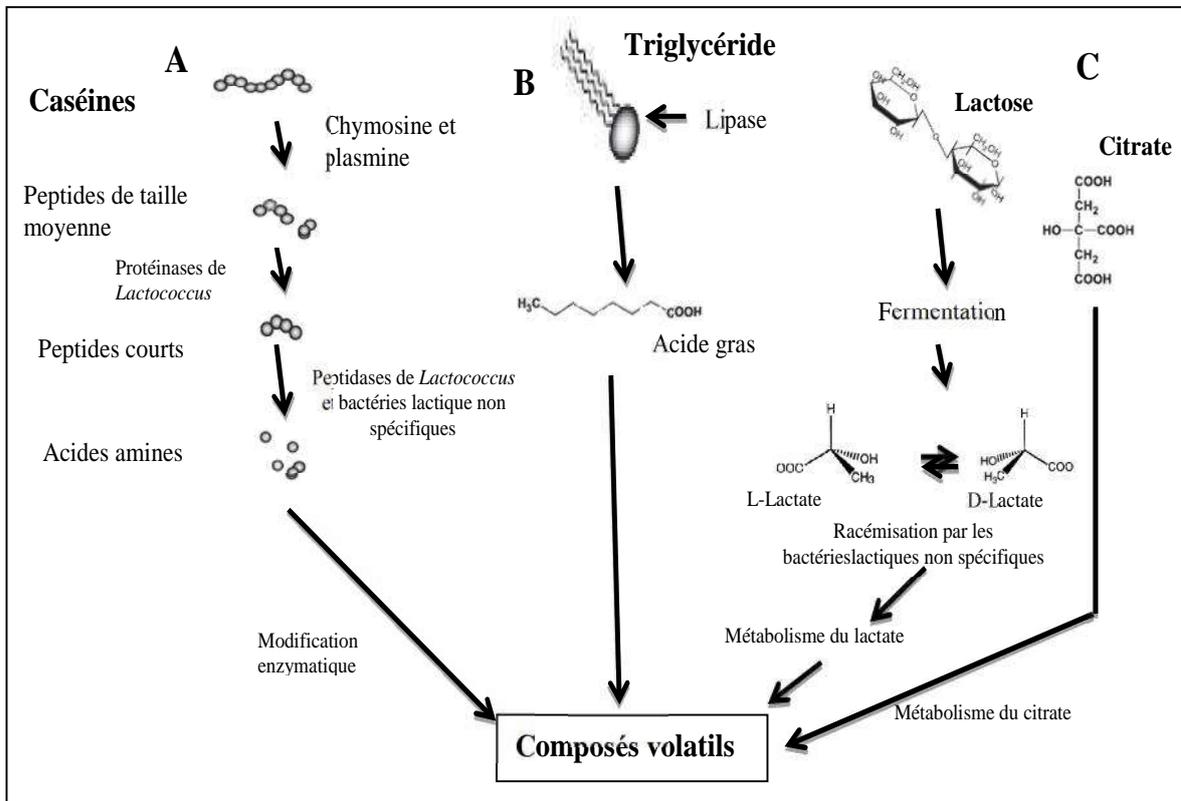


Figure 1. Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage : (a) protéolyse, (b) lipolyse (c) métabolisme de lactose, de lactate et de citrate (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

4-1. Biochimie de l'affinage

4-1-1. Protéolyse et dégradation des composés protéiques

La protéolyse est l'événement le plus complexe et le plus important des trois événements primaires, qui se produisent dans la plupart des variétés des fromages (FOX *et al.*, 2000 ; PRIPP *et al.*, 2000 ; COKER *et al.*, 2005 ; MCSWEENEY, 2011). Elle est principalement responsable des changements de texture et apporte une contribution significative pour les propriétés organoleptiques (SMIT *et al.*, 2000 ; UPADHYAY *et al.*, 2004).

Selon GRAPPIN *et al.* (1985) et PAVIA *et al.* (2000), la protéolyse peut être considérée comme deux phénomènes, 'protéolyse primaire' et 'protéolyse secondaire'

La protéolyse primaire représente l'étendue de la dégradation des caséines native en gros peptides, et essentiellement liée à l'action des protéases contenues dans la présure, notamment la chymosine et à celle de la plasmine, la protéolyse primaire est évaluée par électrophorèses. Et la "protéolyse secondaire" correspond à l'hydrolyse des gros peptides par l'action des protéinases et des peptidases des bactéries lactiques "levains" et "non levains" qui donnent des peptides plus courts et des acides aminés. La quantité globale de

ces composés est mesurée par le fractionnement des matières azotées et leurs proportions sont évaluées par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

4-1-1-1 Principales enzymes protéolytiques

Le fromage contient une large gamme des protéinases et des peptidases, qui proviennent de diverses origines (Tableau 1),

- Les protéases indigènes ou natives du lait;
- Les protéases exogènes rajoutées au lait dans le but de le coaguler ;
- Les protéases endogènes apportées par les microorganismes du lait.

a. Protéases indigènes ou natives du lait

Le lait contient un certain nombre des protéinases indigènes, dont la plasmine et la Cathepsine D (protéinase acide), sont les plus importantes en plus des autres protéinases (aminopeptidase, thrombine,..) qui présentent moins d'importance (FOX, 2003 ; MCSWEENEY, 2011). La plasmine est comme la trypsine, protéinase à sérine avec un pH optimum à environ 7,5 ayant une spécificité élevée pour des liaisons peptidiques contenant la lysine sur le côté N-terminal (SOUSA *et al.*, 2001). Elle a une activité sur toutes les caséines, et spécialement sur caséine-_{s2} et caséine-_{s1}. Le clivage de caséine-_{s1} par la plasmine se fait au niveau des trois sites, Lys²⁸-Lys²⁹, Lys¹⁰⁵-His¹⁰⁶, et Lys¹⁰⁷-Glu¹⁰⁸, avec la formation de caséine-₁ (CN- f29–209), caséine-₂ (CN- f106–209), et caséine-₃ (CN- f108–209), et une certaine protéose peptones (PPs) (PP5 (CN- f105/107), PP8 lent (CN- f29–105/107), et PP8 rapide (CN- f1–28). Caséine-_{s2} est aussi susceptible à l'action de plasmine en solution et huit liaisons sont hydrolysables rapidement (Lys²¹-Gln²², Lys²⁴-Asn²⁵, Arg¹¹⁴-Asn¹¹⁵, Lys¹⁴⁹-Lys¹⁵⁰, Lys¹⁵⁰-Thr¹⁵¹, Lys¹⁸¹-Thr¹⁸², Lys¹⁸⁸-Ala¹⁸⁹, et Lys¹⁹⁷-Thr¹⁹⁸) (FOX, 2003). Alors que la caséine-_{s1} est moins susceptible au plasmine que la caséine-_{s2} et caséine-_{s1}, elle est facilement hydrolysée en solution; les grands produits de base sont les caséines-_{s1}. La formation de ce composant mineur de caséine a été attribuée à l'action de plasmine sur _{s1}-caséine (FOX *et al.*, 2000 ; KELLY et FOX, 2006).

La Cathepsine D, protéinase acide indigène du lait, elle est relativement résistante à la chaleur (complètement inactivée par un traitement à 70°C pendant 10 min), son pH optimum d'activité est de 4 (FOX *et al.*, 2000 ; MCSWEENEY, 2011). MCSWEENEY *et al.* (1995) montrent que la Cathepsine D du lait partiellement purifié dégrade la caséine-_{s1} à un peptide ayant la même masse moléculaire et même mobilité électrophorétique de _{s1}-CN (f24-199), ce qui est un des peptides primaires produits à partir de caséine-_{s1} par la chymosine. La spécificité protéolytique de la Cathepsine D sur caséine-_{s1} est également semblable à celle de la chymosine, La Cathepsine D peut cliver caséine-_{s1}, mais ses

propriétés de coagulation de lait sont très faibles (MCSWEENEY *et al.*, 1995 ; LARSEN *et al.*, 1996).

Tableau 1. Hydrolyse des protéines du lait avec apparition des composés aromatiques et modification de la texture (SERHAN, 2008).

Principales enzymes	Source principale des enzymes	Substrat majeur attaqué	Molécules produites
Chymosine	Présure	Caséines : α_1 , β , κ	Polypeptides
Pepsine	Présure	Caséines : α_1 , β , κ	Peptides
Plasmine	Lait	Caséines : α_2 , β , κ	Caséine-Protéose peptone Polypeptides
Protéases Extracellulaires et Intracellulaires**	Bactéries lactiques		Polypeptides Peptides
Peptidases Aminopeptidases Dipeptidases Carboxypeptidases***	Bactéries lactiques	Polypeptides Peptides	Acides aminés
Décarboxylases	Microcoques Entérocoques <i>Brevibacterium</i>	Acides aminés	Amines
Désaminases	Lactobacilles <i>Geotrichum candidum</i>	Acides aminés	Aldéhydes Ammoniac Acides organiques
	Bactéries lactiques Microcoques Entérocoques	Acides aminés	Nouveaux acides aminés
Lyases	<i>Brevibacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>P. camemberti</i>	Acides aminés	Phénol Indole Composés soufrés

** actives après lyse des bactéries

*** sauf chez les lactocoques.

b- Protéases apportées par les microorganismes du lait

Les microorganismes interviennent dans l'affinage, soit par la libération dans le caillé des enzymes extracellulaires, soit après leur lyse, par les enzymes intracellulaires ou liées à leurs enveloppes cellulaires. Les bactéries lactiques trouvées pendant l'affinage des fromages sont les espèces bactériennes principalement impliquées dans le développement de saveur et dans l'hydrolyse des protéines, leur diversité varie avec le traitement appliqué au lait et avec l'âge des fromages (LOPES *et al.*, 1999 ; RANDAZZO *et al.*, 2009).

Les bactéries lactiques "levains" (ajoutées aux fromages pour améliorer la flaveur ou pour accélérer leur affinage) et "non levains" (microorganismes du lait cru ou qui résistent à la pasteurisation ou qui peuplent le caillé au cours de la production) ont une activité protéolytique considérable et jouent un rôle important dans la dégradation des caséines et des peptides, mené à la production des acides aminés libres (MARTINEZ-CUESTA *et al.*,

2001). Les bactéries lactiques possèdent des systèmes protéolytiques très divers, ces derniers sont nécessaires pour supporter la croissance dans les fromages (MCSWEENEY, 2011).

4-1-1-2. Catabolisme des acides aminés

La protéolyse permet d'affecter indirectement la texture par une augmentation du pH suite à la production de NH_3 qui a lieu après le catabolisme des acides aminés. Le rôle majeur de la protéolyse dans les fromages est la production des acides aminés, qui sont des précurseurs pour une multitude de réactions cataboliques, qui aboutissent à une grande variété de composés volatils (alcools, aldéhydes, acides ramifiés, esters, composés soufres, phénols, ...) responsables de la typicité des fromages (Figure 2) (MCSWEENEY et SOUSA, 2000 ; ARDO, 2001).

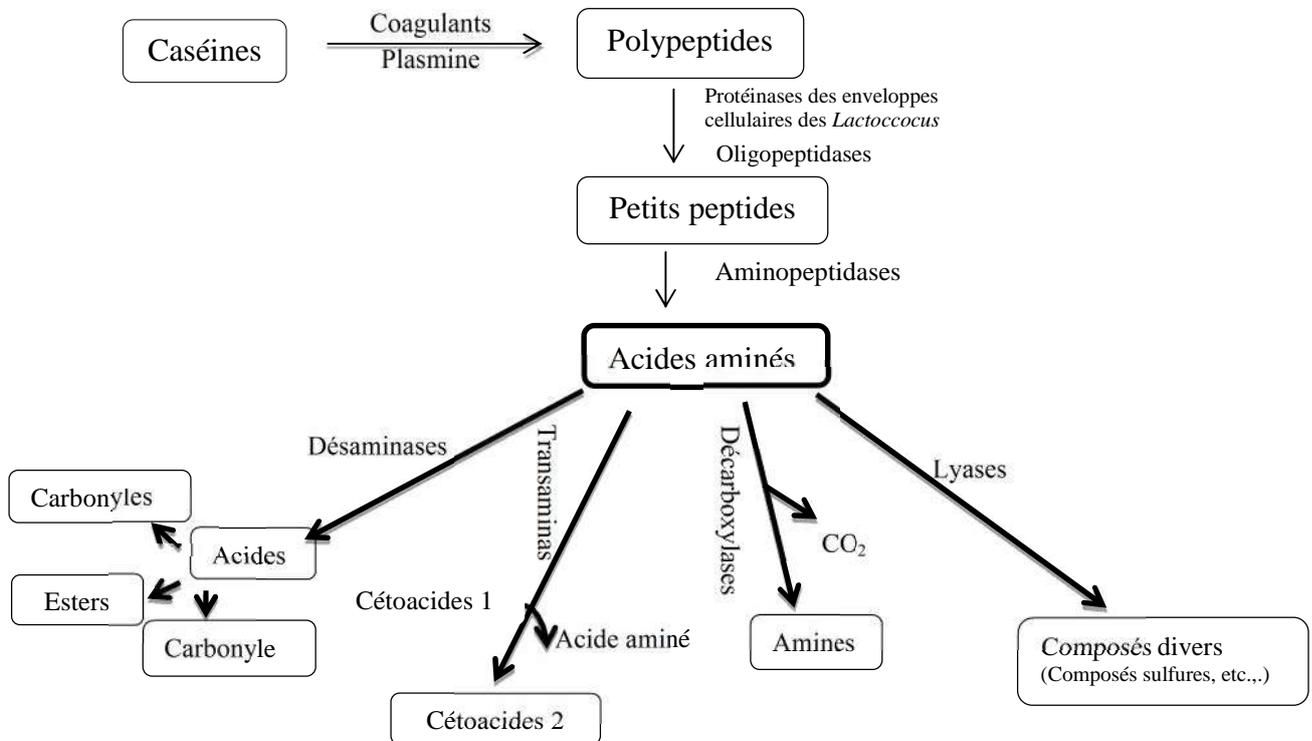


Figure 2. Protéolyse des caséines et catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromages (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

4-1-2. Lipolyse et dégradation des composés lipidiques

La lipolyse est un événement biochimique important se produisant pendant l'affinage des fromages, c'est une voie qui contribue directement à la flaveur de plusieurs variétés, elle a été étudiée intensivement dans quelques variétés comme les fromages Italiens bleus et durs où la lipolyse atteint des niveaux avancés (COLLINS *et al.*, 2003).

La matière grasse laitière est essentielle au développement de la flaveur des fromages. Ceci a pu être démontré quand la matière grasse laitière a été remplacée par d'autres types de matières grasses (FOX et MCSWEENEY, 1998 ; COLLINS *et al.*, 2003).

Les lipides présents dans les fromages peuvent subir une hydrolyse enzymatique ou une oxydation. Les acides gras polyinsaturés sont sujets à l'oxydation, ce qui favorise la formation d'aldéhydes. L'oxydation des lipides est limitée dans la matrice fromagère, probablement en raison du faible potentiel redox (environ -250mV) et par la présence des antioxydants naturels comme la vitamine E (FOX *et al.*, 2000).

La lipolyse dans les fromages est due à la présence d'enzymes lipolytiques qui coupent les liaisons esters des triacylglycérols, produisant des acides gras libres, des mono- et des diacylglycérols (COLLINS *et al.*, 2003). Les acides gras libres sont des précurseurs importants des réactions cataboliques qui donnent des composés volatils (Figure 3). Cependant, ces réactions cataboliques ne sont pas très bien maîtrisées (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

4-1-2-1. Agents de la lipolyse

Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des lipides des fromages, sont des lipases et des estérases (COLLINS *et al.*, 2003 ; BROOME et POWELL, 2011), proviennent d'un certain nombre des sources, y est compris le lait, les bactéries lactiques "levains" et "non levains", et dans certains fromages, les coagulants ou les lipases additionnées (MCSWEENEY et SOUSA, 2000 ; BROOME et POWELL, 2011).

a- Lipases du lait

Le lait contient trois types d'estérases,

- Estérase type-A, ester carboxylique hydrolase, qui hydrolyse les esters aromatiques.
- Estérase type-B (glycéroltricarboxyle estérase, estérase aliphatique), ces enzymes sont les plus actives sur les esters aliphatiques,
- Estérase type-C, cholinestérase (FOX, 2003).

La lipase isolée par FOX et TARASSUK (1968) est en fait, une lipoprotéine lipase (LPL) qui est la principale et probablement la seule lipase indigène en lait de vache (FOX *et al.*, 2000). Cette lipoprotéine lipase hydrolyse préférentiellement les triacylglycérols à chaînes de longueur moyenne par rapport aux triacylglycérols à longues chaînes. OLIVECRONA *et al.* (1992) ont montré que la lipoprotéine lipase est relativement non spécifique pour un type d'acide gras, mais qu'elle est plutôt spécifique pour les positions *sn-1* et *sn-3* des mono, di- et triacylglycérols.

b- Enzymes microbiennes lipolytiques

Pour hydrolyser la matière grasse laitière dans le lait et les fromages, les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser une multitude d'esters d'acides gras, des substrats de tri-, di- et monoacylglycérols (LIU *et al.*, 2001). En raison de leur présence, à des taux élevés durant la période d'affinage des fromages, ces bactéries sont considérées comme responsables de la libération de niveaux non négligeables d'acides gras libres malgré leur faible activité lipolytiques (COLLINS *et al.*, 2003).

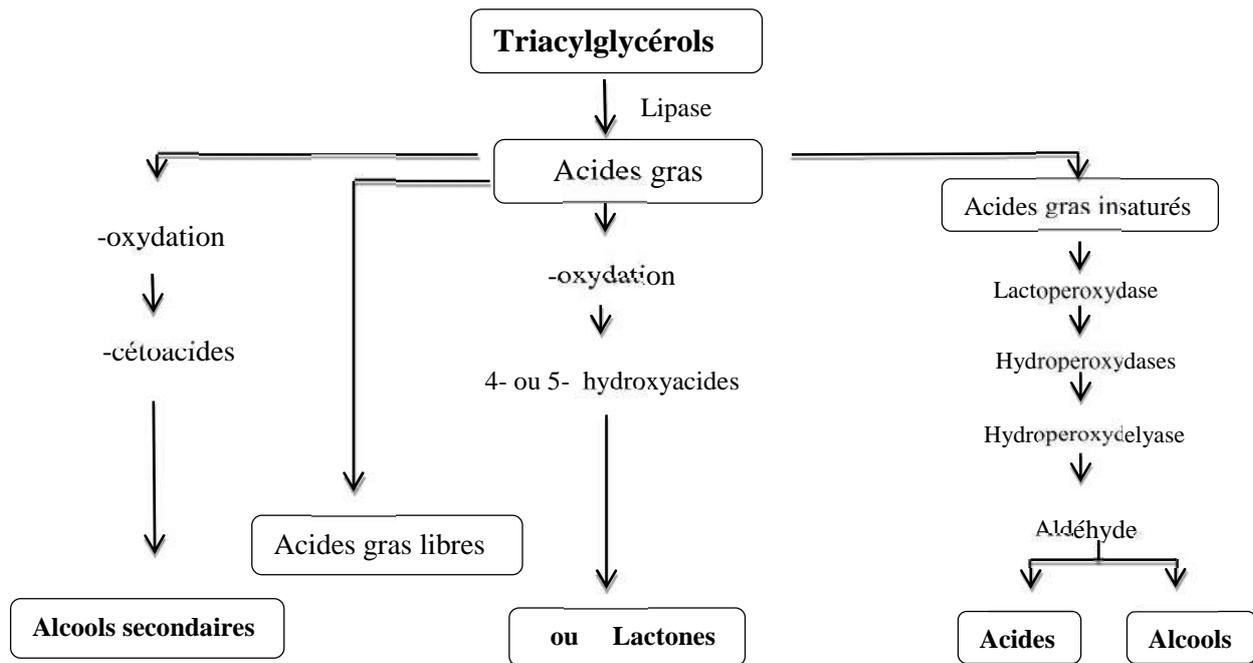


Figure 3. Principales voies cataboliques des acides gras libres dans les fromages (MOLIMARD et SPINNLER, 1996).

Des estérases de plusieurs bactéries lactiques ont été purifiées et caractérisées à de divers degrés. Ces bactéries lactiques incluent *Lactococcus Lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, et *Streptococcus Thermophilus* (HOLLAND *et al.*, 2005).

4-1-3. Glycolyse et métabolisme du lactose

Le lactose peut être métabolisé par de nombreux microorganismes présents dans le lait et les pâtes fromagères. Ce diholoside est clivé par la β -galactosidase en glucose et galactose. Ces deux sucres sont ensuite dégradés selon la voie principale des hexoses phosphates (voie d'Embden-Meyerhof) et puis selon la voie des pentoses phosphates (MARILLEY et CASEY, 2004).

Le lactose fournit de l'acide lactique par fermentation homolactique, mais par fermentation hétérolactique, il donne du CO₂, de l'éthanol et de l'acide acétique. La

fermentation alcoolique par les levures donne du CO₂, de l'éthanol et de l'acétaldéhyde. La fermentation propionique donne de l'acide propionique et du CO₂. L'oxydation par le cycle de Krebs, due aux levures et aux moisissures produit du CO₂ et de l'H₂O (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

4-2. Microbiologie de l'affinage

La flore microbienne du lait cru participe d'une façon importante à l'établissement des caractéristiques organoleptiques des fromages et ce, indépendamment de la présence des ferments (MICHEL *et al.*, 2001). La signature microbienne d'un fromage ne provient pas des espèces spécifiques mais d'un équilibre entre l'ensemble des souches appartenant à plusieurs espèces et présentes à des niveaux différents, ainsi de la diversité microbienne des laits crus et des terroirs naît la diversité des fromages (MICHEL *et al.*, 2005).

4-2-1. Flore bactérienne associée à l'affinage

Le fromage est un écosystème microbien complexe se compose des bactéries, des levures et des moisissures, qui contribuent fortement au processus de l'affinage (PELAEZ et REQUENA, 2005). Cette communauté pourrait être divisée essentiellement en deux groupes : les bactéries lactiques "levains", et la microflore secondaire, qui comporte les quatre groupes suivants : (i) les bactéries lactiques "non levains" (NSLAB : *Non Starter Lactic Acid Bacteria*) appartenant principalement aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*, (ii) les bactéries propioniques, (iii) les moisissures (iv) et les levures et bactéries qui poussent à la surface (BERESFORD et WILLIAMS, 2004).

4-2-2. Bactéries lactiques

4-2-2-1. Bactéries lactiques levains

Dans la plupart des fromages, des souches des bactéries lactiques sélectionnées (des ferments) sont préalablement ajoutées au lait au début de la fabrication. Elles sont divisées en deux types : mésophile et thermophile (TEMMERMAN *et al.*, 2004).

La fonction primaire des bactéries lactiques 'levains' est de produire suffisamment d'acide pendant la fabrication permettent ainsi une diminution rapide de pH du lait à un niveau désiré. Cependant, elles contribuent également à l'affinage du fromage puisque leurs enzymes sont impliquées dans ce processus (BERESFORD et WILLIAMS, 2004). Ces enzymes peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par l'autolyse bactérienne liée à l'âge de la cellule ou aux conditions physiologiques défavorables qui activent les autolysines capables d'hydrolyser les peptidoglycanes de la paroi (ROUDJ *et al.*, 2009), le dégagement rapide des enzymes intracellulaires due à l'autolyse des bactéries lactiques

dans la matrice des fromages accélère le processus de maturation (LORTAL et CHAPOT-CHARTIER, 2005).

4-2-2. Bactéries lactiques non levains

Tous les fromages à n'importe quel âge d'affinage contiennent des bactéries lactiques non levains (FOX *et al.*, 2000 ; BERESFORD *et al.*, 2001). Ils comportent principalement les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, en particulier *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus sp.* (CROW *et al.*, 1995 ; COURTIN *et al.*, 2002). Le lait cru et l'environnement des fermes sont les sources principales des bactéries lactiques non levains en fromage (BERESFORD *et al.*, 2001).

4-2-3. Complexités, biodiversités et interactions de la flore microbienne

La flore microbienne du fromage est très complexe et diversifiée (PELAEZ et REQUENA, 2005 ; IRLINGER et MOUNIER, 2009). Elle est plus complexe en fromages du lait cru qu'en fromages du lait pasteurisé, menant aux différences de la qualité sensorielle entre ces deux types des fromages (BEUVIER et BUCHIN, 2004 ; SETTANNI et MOSCHETTI, 2010).

La complexité de la flore microbienne est liée à son importance quantitative et à sa diversité qualitative et surtout à son évolution permanente. Cette évolution peut être la conséquence des variations des conditions du milieu. L'environnement très sélectif conditionne le développement et la survie des micro-organismes pendant la fabrication et l'affinage des fromages (BERESFORD *et al.*, 2001). La diversité de la microflore du fromage contribue largement à la complexité du processus d'affinage, cette microflore a une importance cruciale pour développer les caractéristiques sensorielles de chaque variété de fromage traditionnel (PELAEZ et REQUENA, 2005).

La microflore associée au fromage contribue à la biopréservation et le développement des propriétés organoleptiques. Par conséquent, se démêlant la diversité microbienne et le fonctionnement de ces écosystèmes est un défi extraordinaire pour plus d'efficacité de contrôler la qualité et la sécurité des fromages (IRLINGER et MOUNIER, 2009 ; SETTANNI et MOSCHETTI, 2010).

Les interactions entre les microorganismes, par exemple les effets de synergie et d'antagonisme, a un impact sur leur survie, leur croissance et son activité dans les fromages (PELAEZ et REQUENA, 2005). La croissance des bactéries lactiques elles-mêmes détermine l'inhibition des microorganismes peu désirés. Cependant, leur capacité de produire des bactériocines est d'importance de base dans les stratégies de la biopréservation des aliments (SETTANNI et MOSCHETTI, 2010). FRANCIOSI *et al.*,

(2009) ont constaté que la production de bactériocine par *Enterococcus faecalis* persiste plus longtemps, que d'autres souches des bactéries lactiques non levains pendant la maturation du fromage *Puzzonedi Moena*.

GIANNOU *et al.*, (2009), ont évalué l'effet d'une souche *Enterococcus faecium* produisant l'enterocine sur *Listeria monocytogenes* dans un fromage Grec affiné 'Graviera' stocké dans différentes conditions. Les principales conclusions, ont été que les bactériocines abaissent efficacement la charge de l'agent pathogène.

Deux souches des bactéries lactiques non levains (*Enterococcus faecium* FAIR-E 198 et *Lactobacillus plantarum* ALC 01), responsables de la production des bactériocines, ont été employés en association dans la fabrication du fromage 'Minas Frescal' par NASCIMENTO *et al.*, (2008), dans cette étude, *Bacillus cereus* est la plus susceptible aux bactériocines.

Les diverses études sur la microbiologie des fromages montrent qu'il s'agit de véritables écosystèmes microbiens, à l'intérieur desquels il existe de nombreuses interactions entre les différents microorganismes et avec le milieu dans lequel ils vivent (PELAEZ et REQUENA, 2005).

Tableau 2. Inventaire des interactions microbiennes en fromages (IRLINGER et MOUNIER, 2009).

Type d'interaction	Effet en fromage et/ou molécules produit.	Microorganismes impliqués	Phénomène microbiologique observé
Commensalisme	Désacidification extérieure de fromage, Utilisation d'acide lactique, production des métabolites alcaline (NH ₃)	Levures, bactéries d'affinage	Croissance des bactéries acido-sensibles
Amensalisme	Acidification du caillé, acides organiques (acide lactique), Bactériocines	Bactéries lactiques, microorganismes de détérioration, et bactéries pathogènes	Inhibition des bactéries acido-sensibles
Compétition	La captation du fer L'effet Jameson	Bactéries contenant des sidérophores, bactéries auxotrophes Biofilms présents en surface des planches d'affinage des fromages à pâte molle	La capacité de réduction de la colonisation des souches auxotrophes Limitation de colonisation des <i>L. monocytogenes</i>
Parasitisme	Défaillance de fermentation	Bactériophage, Bactéries	Inactivation des souches dominantes.

Ainsi, selon les conditions physico-chimiques de l'environnement, à un moment donné de l'affinage, certains microorganismes se multiplient activement alors que d'autres tendent à disparaître. Les équilibres entre les différents groupes des microorganismes et l'importance relative des populations sont donc en évolution constante. Les interactions observées dans des cultures mixtes peuvent être positives, neutres ou négatives et sont classées en 4 catégories (Tableau 2) : l'amensalisme, la compétition, la commensalisme, et le parasitisme (SIEUWERTS *et al.*, 2008), la plupart des interactions microbiennes identifiées en fromages sont liées aux bactéries lactiques, en raison d'une connaissance plus approfondie de leur physiologie et leur génétique (IRLINGER et MOUNIER, 2009).

4-2-4. Facteurs de variation de l'affinage

Les facteurs susceptibles d'agir sur le développement des microorganismes, la production des enzymes et l'activité enzymatique peuvent influencer de façon déterminante sur le processus de maturation de la pâte fromagère (ECK, 1990).

Les facteurs influençant sur la croissance des microorganismes en fromage incluent l'activité de l'eau, concentration du sel, potentiel d'oxydoréduction, pH, température de maturation, et la présence ou l'absence des bactériocines et autres métabolites produits pendant l'affinage. Individuellement, l'effet de ces facteurs ne peut pas être très important, mais leur effet conjoint est le facteur réel (FOX *et al.*, 2000).

a) L'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est un facteur important dans le développement microbien et pour l'expression de l'activité enzymatique, la plupart des bactéries exigent un a_w supérieure à 0,98 pour leur croissance. La croissance des microorganismes à faible valeurs d' a_w est caractérisée par augmentation de la phase de latence et diminution sélective de la vitesse de croissance. Les bactéries lactiques généralement exigent des valeurs d' a_w un peu élevées que d'autres bactéries. L' a_w minimum pour *Lb. lactis*, *Sc. thermophilus*, *Lb. helveticus*, et *P. freudenreichii* est environ 0.93, 0.98, 0.96, et 0.96, respectivement (COGAN, 2011).

b) Le sel

Le facteur inhibiteur principal dû au sel est probablement la réduction de l' a_w qui se produit quand le sel est dissous dans l'eau. La nature des ions est également importante (par exemple, Na^+ est un inhibiteur beaucoup plus efficace que K^+) (FOX *et al.*, 2000).

Le salage diminue aussi l'activité des enzymes (lipases et protéases notamment) dans le fromage type *Camembert*. Il a été montré, par KIKUSHI et TAKAFUJI (1971),

qu'un taux de sel de 4% en poids entraîne une diminution sensible du degré de protéolyse de 40% après vingt jours d'affinage (Cité par OUALI, 2003).

c) Potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction du lait est environ +150mV et celui des fromages est environ -250mV. Le mécanisme exact de l'abaissement du potentiel d'oxydoréduction dans les fromages n'est pas clair, mais il est probablement lié à la fermentation du lactose en acide lactique, il est probablement lié à la réduction d'un peu d'O₂ dans le lait à H₂O (ou à H₂O₂ et puis à H₂O). En raison de ces réactions, le fromage est essentiellement un système anaérobie, dans lequel seulement les microorganismes anaérobies (facultatif ou obligatoire) peuvent se développer (COGAN, 2011).

d) pH

L'influence du pH sur le développement microbien et l'activité enzymatique est particulièrement déterminante. La plupart des bactéries ont besoin d'un pH neutre pour la croissance optimale et poussent mal aux valeurs de pH inférieur à 5,0. L'activité des enzymes est également très sensible aux variations de pH. En effet, l'activité de la plupart des protéases microbiennes est maximale pour des pH compris entre 5,5 et 7,5 et celle des lipases pour des pH allant de 7,5 à 9,0. Au-dessous de pH 4,5, l'activité et la stabilité de nombreuses enzymes sont fortement réduites (WEIMER *et al.*, 1997 ; GOBBETTI *et al.*, 1999).

e) Température

La température joue un rôle déterminant sur le développement microbiens et les processus enzymatiques. Les températures optimales sont en fonction du groupe microbien considéré. Elles sont comprises entre 20 et 30 °C pour les levures, les moisissures et les bactéries de surface. De même, les températures optimales d'activité des enzymes varient selon leur type ; elles sont de l'ordre de 30 à 35°C pour les lipases, et de 40 à 45 °C pour les protéases. En pratique, les températures d'affinage, adaptées aux types des fromages fabriqué, sont très inférieures aux valeurs précédentes. Pour la plupart des fromages à pâte molle, la température des caves varie entre 8 et 14 °C. Cette pratique permet de ralentir l'évolution des processus biochimiques et d'obtenir des transformations lentes et mieux contrôlées de la pâte fromagère (FOX *et al.*, 2000).

Pour un type de fromage donné, une température plus basse ou plus élevée que la normale se traduit par un affinage plus ou moins rapide. Cependant, toute modification de la température n'a pas pour seul effet de changer globalement la vitesse d'affinage. En effet, selon le groupe microbien ou le processus enzymatique, son influence sera plus ou moins grande et la dynamique interne du phénomène sera profondément modifiée. Toute

variation de température provoque donc des différences dans les caractéristiques des fromages notamment sur la protéolyse et la texture (LENOIR *et al.*, 1985).

5- Aperçu sur les méthodes de caractérisation de la protéolyse et de l'écosystème microbien des fromages

Dans la complexité des diverses réactions de transformations, et la diversité de la microflore du fromage, qui ont lieu au cours de l'affinage et qui contribue fortement à la complexité de ce processus, il n'est pas toujours facile de mettre en œuvre des approches expérimentales qui puissent rendre compte de la nature et de l'importance de ces phénomènes.

Néanmoins, et afin d'évaluer cette complexité, particulièrement la diversité microbiologique, et le principale événement biochimique qu'est la protéolyse, différentes méthodes analytiques sont proposées avec une variabilité dans leur disponibilité, sa facilité de mise en œuvre, leur performance et leur coût.

5-1. Modes d'évaluation de l'activité protéolytique

La protéolyse, qui est le phénomène principal et le plus complexe intervenant dans la maturation de la plupart des fromages, est régulièrement évaluée dans les études sur l'affinage et est un indice utile de la maturité et de qualité des fromages. Toute une gamme des méthodes analytiques a été développée afin de permettre une meilleure compréhension de ce phénomène. Les méthodes de suivi de la protéolyse peuvent être classées en deux grandes classes, les méthodes non spécifiques, et les méthodes spécifiques (FOX et MCSWEENEY, 1997 ; FOX *et al.*, 2000).

5-1-1. Méthodes non spécifiques

Les méthodes non spécifiques comprennent la détermination de l'azote soluble, ou extractibles dans ou par l'un des nombreux solvants ou précipitants (Par exemple : l'eau, tampons à pH 4.6, NaCl, l'éthanol, l'acide trichloracétique, l'acide phosphotungstique, et l'acide sulfosalicylique) ou perméable à travers des membranes d'ultrafiltration, et quantifiés par l'une des différentes méthodes (par exemple : Kjeldahl, Biuret, Lowry, Hull...). Un certain nombre des techniques pour quantifier la protéolyse sont basées sur le clivage des liaisons peptidiques, ce qui entraîne la formation d'un nouveau groupe -aminés qui peuvent réagir avec plusieurs chromogènes (par exemple : l'acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS), *o*-phthaldialdéhyde [OPA], fluorescamine) (UPADHYAY *et al.*, 2004).

Ces méthodes sont précieuses pour l'évaluation globale de la protéolyse, et relativement non spécifiques, simples et valables pour la routine afin de suivre suivi de la maturité des fromages (FOX *et al.*, 2000).

5-1-2. Méthodes spécifiques

Les techniques spécifiques, principalement la chromatographie et l'électrophorèse, permettent de séparer les peptides ou les acides aminés libres (FOX et MCSWEENEY, 1997 ; UPADHYAY *et al.*, 2004).

5-1-2-1. Techniques électrophorétiques

L'électrophorèse sur gel est une technique utilisée pour la séparation des biomolécules, en particulier les acides nucléiques et les protéines en utilisant un courant électrique appliqué à une matrice de gel, qui peut être réalisée par plusieurs supports (l'amidon, l'agarose, l'acétate de cellulose, le polyacrylamide...etc.).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide, en conditions dissociantes en présence d'urée (PAGE-urée), est un outil puissant pour la caractérisation de la protéolyse durant les premiers stades de la maturation des fromages et pour évaluer l'hydrolyse des caséines (MARCOS *et al.*, 1979 ; SOUSA et MALCATA, 1997). PAGE-SDS, qui est largement utilisées en biochimie, est moins approprié pour étudier la protéolyse dans le fromage parce que cette technique sépare les protéines sur la base de leur taille, et les caséines ont une masse moléculaire un peu similaire (UPADHYAY *et al.*, 2004).

Avec ce type d'évaluation qualitative, TRIEU-CUOT et GRIPON, (1982) ont utilisé une électrophorèse bidimensionnelle en réalisant une isoélectrofocalisation (IEF) dans une première dimension et une SDS-PAGE dans l'autre dimension perpendiculaire. Ce système combiné assure une analyse plus performante pour que les spots obtenus soient quantifiés par densitomètre.

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

5-1-2-2. Techniques chromatographiques

Un certain nombre des techniques chromatographiques sont utilisées afin d'analyser les peptides issus de la protéolyse au cours de l'affinage, telles que perméation sur gel, échange d'ion, interaction hydrophobe, et la chromatographie d'exclusion (UPADHYAY *et al.*, 2004),.

En basse pression, ces méthodes présentent certaines limites notamment en ce qui concerne la séparation des produits ayant des poids moléculaires faibles. Pour cette raison, on a recours de plus en plus aux chromatographies se déroulant à des pressions plus élevées, principalement la chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

La chromatographie liquide à haute pression en phase inverse (RP-HPLC), a été employée intensivement pour caractériser des peptides dans des hydrolysats des caséines. La technique est également très précieuse pour la résolution des peptides courts dans des fractions des fromages. Des extraits hydrosolubles ont été habituellement employés pour l'analyse par RP-HPLC (FOX et MCSWEENEY, 1997) mais d'autres fractions ont été également étudiés, y compris les extraits solubles à pH 4,6 (KAMINOGAWA 1980 ; CHRISTENSEN *et al.*, 1989).

Un protocole standard pour l'élution a été développé pour les protéines et les peptides. L'eau avec l'acide trifluoroacétique à 0,1% est utilisée comme la partie hydrophile de la phase mobile, et la partie organique 'acétonitrile' (contenant également 0,1% de TFA) comme partie hydrophobe. Les peptides sont détectés généralement par spectrophotométrie UV à 210-220 nm et/ou 280 nm (ARDÖ *et al.*, 2011). Cette méthode se caractérise par une sensibilité, une résolution et une reproductibilité élevées. Elle présente néanmoins, l'inconvénient d'être peu accessible par rapport à son coût et à sa mise en œuvre.

5-2. Les méthodes de caractérisation de l'écosystème microbien des fromages

La compréhension de l'écosystème des fromagers et des fonctions qu'il génère pendant l'affinage est un enjeu important tant du point de vue scientifique que pour ses applications potentielles.

Traditionnellement, la plupart des connaissances de la diversité bactérienne dans les fromages proviennent à partir des études basées sur la croissance des microorganismes sur des milieux sélectifs et leur identification ultérieure, en utilisant la caractérisation phénotypique. Bien que ces méthodes peuvent être assez sensibles, ils ne permettent pas toujours la discrimination des espèces ou des souches, ni la détection des relations phylogénétiques entre certains groupes des bactéries. Ainsi, l'application des méthodes moléculaires, en particulier les techniques basées sur la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sont utiles pour répondre aux questions écologiques (RANDAZZO *et al.*, 2009). La combinaison d'approche culture dépendante et indépendante, semble être indispensable pour la compréhension des phénomènes microbiens qui régissent l'affinage.

5-2-1. Approche classique

Avant le développement des outils de biologie moléculaire, l'identification de la flore fromagère était uniquement basée postérieurement sur une approche d'isolement des souches puis l'identification à partir des caractères phénotypiques, tels que les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Afin de pouvoir déterminer cette diversité, le choix des milieux et des paramètres de cultures des isolats tels que la composition, le pH, la température et le temps d'incubation, reste primordial (JANY et BARBIER, 2008). On a pu estimer que 90 % de la population microbienne fromagère est cultivable (DELBES et MONTEL, 2005 ; ABRIOUEL *et al.*, 2008).

Dans le but de bien étudier l'ensemble de la diversité et de la complexité d'un écosystème microbien, les méthodes de culture dépendante sous estiment la diversité réelle de l'écosystème et sont souvent longues et fastidieuses (JANY et BARBIER, 2008).

5-2-2. Approche moléculaire

5-2-2-1 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Le principe du PCR repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication *in vitro* des séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliard des exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel) (MICHAEL et MØLLER, 2006).

L'ADN matriciel peut tout autant être de l'ADN génomique que de l'ADN complémentaire obtenu par transcription inverse à partir d'un extrait d'ARN messager, ou encore de l'ADN mitochondrial (PRIMOSE *et al.*, 2004).

La technique consiste en une suite répétitive de réaction aux paramètres bien définies, qui sont désormais programmés et de mieux automatisés depuis 1987. Les opérations se déroulent en trois étapes : dénaturation thermique, hybridation et élongation (SCRIBAN, 1999).

a-Dénaturation thermique

La première étape s'effectue à une température d'environ 94°C, dite température de dénaturation ; à cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la répllication est dénaturé : les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et l'ADN double brin se dénature en ADN simple brin (PRIMOSE *et al.*, 2004).

b-Hybridation

Elle s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 60°C, dite température d'hybridation des amorces (SCHEMID, 2005). La diminution de la température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires des régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel (SCRIBAN, 1999).

c-Elongation

Cette étape s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C la Taq polymérase (ADN polymérase thermostable) se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées (PRIMSOE *et al.*, 2004).

5-2-2-2 Méthodes moléculaires culture-indépendante

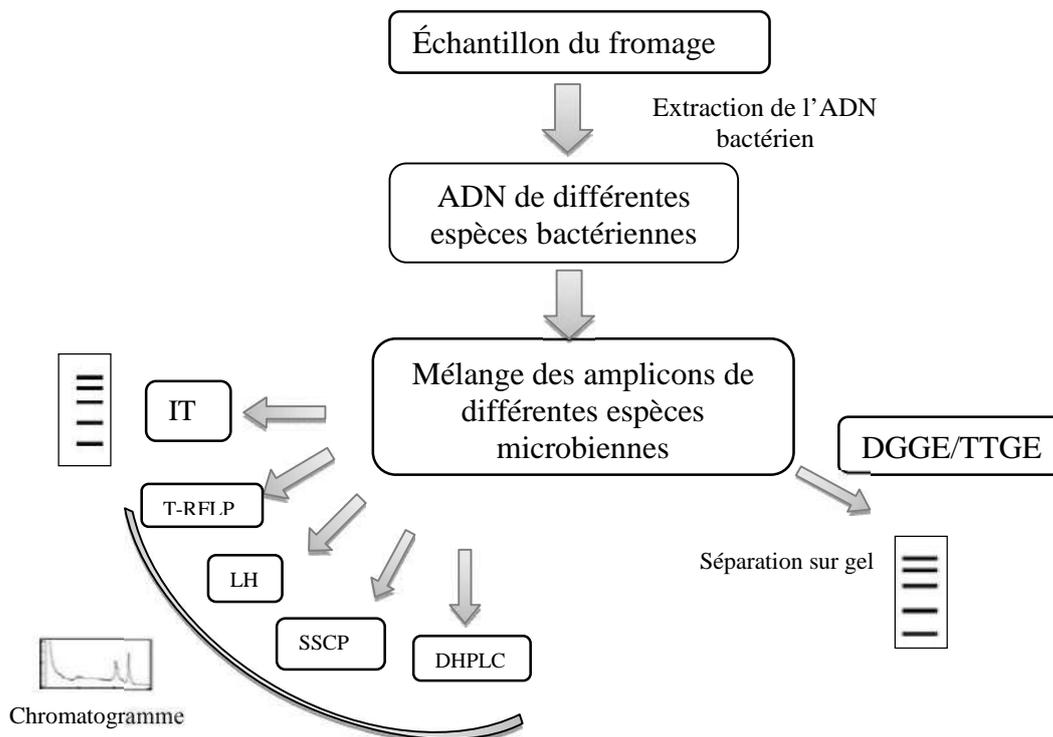
L'avènement de la biologie moléculaire et le développement des techniques de manipulation de l'ADN, permettant d'extraire l'ADN (ou l'ARN) à partir de la matrice fromagère et de produire une empreinte génétique à partir d'un produit de PCR (RANDAZZO *et al.*, 2009).

Ces techniques donnent une image globale de la structure génétique de la communauté bactérienne. Les gènes cibles les plus utilisés lors de l'analyse des flores microbiennes sont ceux de l'opéron ribosomal, particulièrement l'ARN 16S. Les propriétés phylogénétiques de l'ARN 16S ainsi que le nombre important des séquences disponibles représentent des avantages considérables. Les gènes bactériens codant pour l'ARNr 16S contiennent 9 régions très stables V1-V9, dont la diversité de séquence diffère de manière importante selon l'espèce (BAKER *et al.*, 2003). Dans les fromages, la région V3 est la cible qui a été la plus intensivement employée (JANY et BARBIER, 2008),

Plusieurs types des techniques moléculaires ont été développés au cours de la dernière décennie. Un diagramme récapitulatif des différentes approches moléculaires pouvant être utilisées pour l'étude d'un écosystème microbien est représenté dans la figure 4.

La PCR-DGGE et la PCR-TTGE (*Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis*, et *temporal temperature gel electrophoresis*) sont les techniques les plus utilisées avec succès pour l'identification des écosystèmes des fromages (OGIER *et al.*, 2002; RANDAZZO *et al.*, 2006; ABRIOUEL *et al.*, 2008; GALA *et al.*, 2008; NIKOLIC *et al.*, 2008).

Les méthodes moléculaires culture-indépendantes surmontent non seulement les problèmes liés aux méthodes classiques, mais sont également souples et rapides, et fournissent des résultats fiables (RANDAZZO *et al.*, 2009). Ces techniques sont basées sur le principe de l'extraction directe de l'ADN totale à partir des échantillons des fromages. Des fragments d'ADN sont amplifiés à l'aide des amorces universelles. La séparation des amplifiats du PCR, qui sont semblables dans la taille mais différent dans les séquences peuvent être séparés par DGGE/TTGE (JANY et BARBIER, 2008 ; RANDAZZO *et al.*, 2009).



ITS, intergenic transcribed spacer; *T-RFLP*, terminal restriction fragment length polymorphism; *LH*, length heterogeneity; *SSCP*, single-strand conformation polymorphism; *DHPLC*, denaturing high-performance liquid chromatography.

Figure 4. Plan de différentes possibilités de l'analyse de fromage par les méthodes moléculaires (ERCOLINI et COPPOLA, 2011).

Pour la PCR-DGGE, les conditions de dénaturation sont basées sur l'utilisation des dénaturants chimiques (formamide et urée) incorporés à un gel d'acrylamide avec un gradient de dénaturation linéaire. L'électrophorèse de DGGE est effectuée à une température constante, généralement entre 55°C et 65°C (ERCOLINI, 2004). Pour la PCR-TTGE, le gradient de dénaturation est obtenu en variant la température avec le temps sans utilisation des dénaturants chimiques (JANY et BARBIER, 2008). Pour les espèces bactériennes de faible pourcentage GC (T_m de la région V3 inférieure à 75°C), la résolution optimale a été obtenue par TTGE, cependant pour les bactéries de moyenne ou

haute pourcentage GC (T_m de la région V3 supérieure à 75°C), la meilleure séparation a été obtenue par DGGE (OGIER *et al.*, 2004)..

La DGGE et la TTGE sont des méthodes de choix quand l'information désirée ne doit pas être aussi phylogénétiquement approfondie. Ces techniques permettent la surveillance des changements temporels de structure de la communauté microbienne et fournissent une vue simple des espèces microbiennes dans un échantillon (OGIER *et al.*, 2004).

L'un des avantages de ces techniques est que l'on peut également exciser du gel des bandes individuelles d'ADN, les séquencer et les accéder ainsi directement à l'identification des microorganismes par interrogation dans les bases des données. La co-migration des bandes de différentes espèces est toutefois la limite de ces méthodes, en particulier pour l'étude des écosystèmes complexes (HENRI-DUBERNET *et al.*, 2004).

*Matériel et
Méthodes*

1- Echantillonnage

Nous avons collecté six échantillons de fromage *bouhezza* de ferme fabriqués selon la méthode traditionnelle.

1-1. Origine et période de fabrication des échantillons

Les échantillons sont collectés à partir de cinq familles habitant différentes régions rurales de la wilaya d'Oum El Bouaghi (tableau 3), durant la période de l'automne 2010. Ce nombre d'échantillons est limité à cause de manque de fabrication pendant cette période de l'année. Selon les résultats de l'enquête de AISSAOUI ZITOUN (2004), presque 77% des fabrications débutent au printemps et essentiellement au mois de mars.

Tableau 3. Origine et période de fabrication des échantillons.

Echantillons	Origine	Période de fabrication	Date de réception
Ech f1	Commune : Ain Fakroun Da ra : Ain Fakroun	15 Novembre 2010 à 3 Janvier 2011	03 Janvier 2011
Ech f2	Commune : Ain Fakroun Da ra : Ain Fakroun	16 Novembre 2010 à 1 Janvier 2011	01 Janvier 2011
Ech f3	Commune : Ain Fakroun Da ra : Ain Fakroun	20 Novembre 2010 à 20 Décembre 2010	22 Décembre 2010
Ech f4	Commun : Henchir Toumghani Da ra : Ain Kercha	11 Octobre 2010 à 12 Décembre 2010	15 Décembre 2010
Ech f5	Commun : Henchir Toumghani Da ra : Ain Kercha	22 Septembre 2010 à 7 Décembre 2010	12 Décembre 2010
Ech f6	Commun : Ain Kercha Da ra : Ain Kercha	15 Août 2010 à 13 Décembre 2010	16 Décembre 2010

Les échantillons Ech f1 et Ech f2 sont obtenues à partir de deux fabrications de la même famille.

1-2 Diagramme de fabrication

La description de la fabrication des échantillons par leurs fabricants permet de situer les principales étapes du diagramme de fabrication comme l'indique le tableau 4.

En générale une *chekoua* est remplie avec du *Lben* de vache salé (sel de table). Après égouttage de la *chekoua*, des ajouts successifs de *Lben* sont effectués. La fréquence de ces ajouts dépendant essentiellement de la disponibilité de *Lben* et de la vitesse de l'égouttage. A la fin de la fabrication, des quantités de lait cru de vache sont ajoutés, puis le fromage est retiré. Avant la consommation, *bouhezza* peut être assaisonné par l'addition de piment rouge (connu sous le nom de '*kalb el serdouk*').

Tableau 4. Principales étapes du diagramme de fabrication des six échantillons.

Echantillons	Age d'affinage	Matière première	Quantité de sel	Ajout de <i>Lben</i>	Ajout de lait cru	Remplissage de <i>Chekoua</i>	Epices
Ech f1	45 j	<i>Lben</i> de vache	2-3 cuillères/L	Tous les 3-4j.	Non	Moitié	Non
Ech f2	45 j	<i>Lben</i> de vache	2-3 cuillères/L	Tous les 3-4j.	Non	Moitié	Non
Ech f3	60 j	<i>Lben</i> de vache	2-3 cuillères/L	Tous les 1-5 j	Non	Pleine	Non
Ech f4	60 j	<i>Lben</i> de vache	N'est pas bien précisée	Tous les 2-4 j	Oui	Presque pleine	Oui
Ech f5	75 j	<i>Lben</i> de vache	2 cuillères/L	Tous les 2-5 j	Oui	Moitié	Oui
Ech f6	120 j	<i>Lben</i> de vache	2-3 cuillères/L	Tous les 1-5 j	Oui	Pleine	Oui

Les principales étapes du diagramme de fabrication sont presque similaires pour les six échantillons et ressemblent aux étapes du diagramme utilisé par Aissaoui Zitoun (2004), qui est déduit des résultats de son enquête. Cependant il est à noter l'existence de quelques différences dans le diagramme entre les six échantillons. Ces différences correspondent à l'âge de l'affinage, le volume de remplissage de *Chekoua* au départ, la quantité de sel, les fréquences des ajouts de *Lben*, l'ajout du lait cru ou non et l'assaisonnement ou non avant la consommation.

Les échantillons sont congelés à -18°C dans des boîtes stériles depuis leur livraison, jusqu'à leur arrivée aux laboratoires du *CoRFiLaC* à Ragusa-Italie.

2- Caractérisation microbiologique

2-1. Détection des bactéries pathogènes par le système BAX[®].

2-1-1. Principe

Le système BAX[®] est une méthode automatisée qui utilise la technologie de réaction de polymérisation en chaîne (*PCR*) pour la détection des pathogènes dans les aliments (FRANCHIN *et al.*, 2006), et dans les échantillons environnementaux (ANONYME, 2007).

La PCR consiste en une amplification *in vitro* d'une courte séquence d'ADN située entre deux oligonucléotides de synthèse (amorces) (PARFAIT et VIDAUD, 2002). Pour le système BAX[®] les réactifs nécessaires à la PCR, et à la réaction de fluorescence de détection de la présence des fragments d'ADN amplifié sont inclus dans le même tube PCR sous forme des comprimés.

Les comprimés contiennent notamment :

- Les nucléotides et la Taq polymérase.
- Des amorces spécifiques.
- Un marqueur pour la détection par fluorescence des produits de l'amplification.

Une fois que le processus d'amplification par PCR se produit (dans le cas de présence de pathogène), le marqueur dans chaque comprimé des réactifs de système BAX[®] est lié avec les fragments d'ADN double brin, et émet un signal fluorescent en réponse à l'excitation par la lumière. Les mesures de fluorescence sont analysées à l'aide d'un logiciel intégré (BAX[®] system Q7).

Nous avons utilisé l'appareil BAX[®] System (DuPont Qualicon, UK).

Généralement le protocole de détection des pathogènes par le système BAX[®] comprend trois étapes :

- a- Pré-enrichissement et/ou enrichissement ;
- b- Lyse des cellules et libération de l'ADN ;
- c- Amplification et détection.

2-1-2. Détection de *Salmonella*.

a- Pré-enrichissement et enrichissement

Une masse de 25g d'échantillon de fromage est pesée dans un sachet stérile, et 225 mL d'eau peptonée tamponnée (Oxoid, CM0509), supplémentée en novobiocine à 20 mg/L (Oxoid, SR0181E) sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un Stomacher (Stomacher 400 lab blender, UK) pendant 3min. Le bouillon obtenu est incubé pendant 20-24 heures à 42°C.

Après le pré-enrichissement, un volume de 10 µL de bouillon obtenu est alors transféré dans un tube Eppendorf contenant 500 µL de bouillon cœur-cerveille (Oxoid, CM0225) pour une deuxième incubation pendant 3 h à 37°C, pour assurer un enrichissement en *Salmonella*.

b- Lyse des cellules et libération de l'ADN

Pour la préparation du réactif de lyse, 150 µL de protéase ont été additionnés à 12 mL de tampon de lyse (kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Salmonella*, Oxoid QB0608C).

Un volume de 5 µL de bouillon enrichi est ajouté à 200 µL de réactif de lyse dans un tube Eppendorf, puis deux incubations sont effectuées :

- Une première incubation pendant 20 min à 37°C pour la dégradation des protéines cellulaires ;
- Une deuxième incubation pendant 10 min à 95°C pour l'inactivation de la protéase.

Après la lyse, les tubes Eppendorf avec leur lysat sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5 min (2-8°C), avant de passer à l'étape de l'amplification.

c- Amplification et détection

Un volume de 50 µL de lysat est transféré dans un tube PCR contenant un comprimé des réactifs nécessaires à la PCR et à la réaction de fluorescence (kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Salmonella*, Oxoid QB0608C). Après amplification le marqueur lié aux fragments d'ADN amplifié génère un signal fluorescent, qui est automatiquement détecté et analysé par le logiciel BAX[®] System Q7 (la détection se fait de la même manière pour les trois pathogènes).

2-1-3. Détection de *Listeria monocytogenes* (AOCA 2003, 12).

a- Pré-enrichissement et enrichissement

Une masse de 25g d'échantillon de fromage est pesée dans un sachet stérile et 225 mL de bouillon tryptone soja et extrait de levure (LEBB, Oxoid CM0862), sont ajoutés et homogénéisés à l'aide de Stomacher pendant 3min. Puis incubé pendant 22-24 heures à 30°C, afin de permettre un pré-enrichissement.

Après incubation, un volume de 0,1 mL du bouillon est transféré dans 9,9 mL de MOPS-BLED (Oxoid, CM1071B), et incubé pendant 18-24 heures à 35°C, afin de réaliser l'enrichissement.

b- Lyse des cellules et libération de l'ADN

Un volume de 5 µL de bouillon enrichi est ajouté à 200 µL de réactif de lyse (kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Listeria monocytogenes*, Oxoid QB0609C) dans un tube Eppendorf, pour effectuer deux incubations:

- Une première incubation pendant 60 min à 55°C pour la dégradation des protéines cellulaires ;
- Une deuxième incubation pendant 10 min à 95°C pour l'inactivation de la protéase.
Après la lyse, les tubes Eppendorf sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5 min (2-8°C).

c- Amplification et détection

Un volume de 50 µL de lysat est transféré dans un tube PCR contenant (sous forme de comprimé) tous les réactifs nécessaires à la PCR et à la réaction de fluorescence (kit pour analyse de système BAX[®] automatisé, Oxoid QB0609C).

2-1-4. Détection de l'*Escherichia coli* O157:H7

a- Enrichissement

Une masse de 25g de fromage est pesée dans un sachet stérile, et 225 mL de bouillon tryptone soja modifié (Oxoid CM0989), supplémentée en novobiocine à 10 mg/L (Oxoid SR0181E), sont ajoutés et homogénéisés à l'aide de Stomacher pendant 3min, puis incubés pendant 18-24 heures à 42°C.

b- Lyse des cellules et libération de l'ADN

Un volume de 5 µL de bouillon de l'enrichissement est ajouté à 200 µL de réactif de lyse (kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Escherichia coli* O157:H7, Oxoid QB0611C) dans un tube Eppendorf, pour effectuer deux incubations :

- Une première incubation pendant 20 min à 37°C ;
- Deuxième incubation pendant 10 min à 95°C ;

Après la lyse, les tubes Eppendorf sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5 min (2-8°C).

c- Amplification et détection

Un volume de 50 µL de lysat est transféré dans un tube PCR contenant (sous forme de comprimé) tous les réactifs nécessaires à la PCR, et à la réaction de fluorescence (kit pour analyse de système BAX[®] automatisé, Oxoid QB0611C).

Les tubes préparés pour les trois pathogènes sont placés dans le thermocycleur du système BAX[®] et le programme d'amplification est lancé.

2-1-5. Expression des résultats

Les résultats sont présentés selon la présence ou l'absence des pathogènes (négative ou positive).

2-2 Dénombrement des principales flores

Pour la numération bactérienne classique des principales flores, une masse de 10 g de *bouhezza* est mise en suspension dans 90 mL de solution stérile de citrate trisodique à 2% (p/v) à 45°C, après une homogénéisation au Stomacher (Stomacher 400 lab blender, UK) pendant 3min, afin de réaliser une suspension mère (dilution +1) de fromage. Une série de dilutions décimales dans de l'eau peptonée est effectuée. Il est souvent nécessaire d'aller jusqu'à 10^{-7} pour les dilutions de fromage. L'ensemencement a été fait dans deux boîtes de Pétri pour chaque dilution et chaque milieu de culture.

2-2-1. Dénombrement de la flore mésophile totale (ISO 13559-IDF 153, 2002).

La flore totale correspond au dénombrement des germes totaux mésophiles. Le dénombrement est réalisé sur gélose nutritive PCA (*Plate Count Agar*) (PCA, Oxoid CM032S). Le milieu est ensemencé dans la masse, et les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures. Les colonies apparaissent sous différentes tailles et formes.

2-2-2. Dénombrement de la flore fongique (ISO 6611-IDF 94, 2004)

La flore fongique comprend les levures et les moisissures, cette flore est dénombrée sur milieu gélose Oxytétracycline-Glucose (OGYE, Oxoid CM0545), avec ajout de 20 mL/L d'oxytétracycline à 5 mg/mL (Oxoid, SR0073). Le milieu est ensemencé dans la masse et incubé à 25°C pendant 5 jours. Toutes les colonies d'aspect lisse et filamenteux sont comptées.

2-2-3. Dénombrement des coliformes totaux (ISO 4832, 2006)

La recherche des coliformes totaux comme microorganismes marqueurs d'une contamination fécale pour les fromages est la plus approprié (GUIRAUD, 2003).

Pour le dénombrement de ce groupe nous avons utilisé le milieu gélosé VRBL (Oxoid CM0107). Le milieu est ensemencé et incubé à 37°C pendant 24 heures.

2-2-4. Dénombrement des coliformes fécaux

Le dénombrement de ce groupe est réalisé sur le milieu gélosé VRBL (Oxoid CM0107), Le milieu est ensemencé et incubé à 42°C pendant 24 heures.

2-2-5. Flore lactique

Elle est constituée essentiellement des genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Leur recherche est importante car ce sont des germes utiles dans l'affinage. Leur quantification permet le suivi de la maturation des fromages, particulièrement de la protéolyse (OUALI, 2003).

2-2-5-1 Dénombrement des Lactobacilles

Selon GUIRAUD (2003), le milieu de culture et d'isolement de base des Lactobacilles est le MRS (de Man, Rogosa, et Sharpe). Un volume de 0,1 mL d'inoculum est étalé à la surface du milieu. L'incubation se prépare en anaérobiose dans des jarres et par l'utilisation de l'Anaerocult (Anaerocult[®] MERK), à 30°C pendant 48 heures pour les mésophiles, et à 42°C pour les thermophiles pendant 48 heures.

2-2-5-2 Dénombrement des Streptocoques lactiques

Le milieu de dénombrement convenant le plus particulièrement à la culture des streptocoque lactique est le milieu M17 (LEVEAU *et al.*, 1991). Un volume de 0,1 mL d'inoculum est étalé à la surface du milieu M17 (Oxoid, CM0785) et incubé à 30°C pendant 48 heures pour les mésophiles, et à 42°C pendant 48 heures pour les thermophiles.

2-3 PCR-TTGE (PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis)

2-3-1. Principe

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide sous gradient de température dénaturant, est basée sur l'extraction directe de l'ADN microbien de la matrice du fromage (ou d'autres échantillons), et l'amplification du l'ADNr (codant l'ARN ribosomique 16S) à l'aide des amorces universelles. La TTGE est une méthode électrophorétique capable de détecter des différences entre les fragments d'ADN de mêmes tailles mais avec différentes séquences (PARAYRE *et al.*, 2007). Les fragments peuvent être séparés sur un gel de polyacrylamide par un gradient de dénaturation basé sur le profil différentiel de dénaturation des fragments d'ADN amplifié (ERCOLINI, 2008). Le gradient de dénaturation est obtenu en variant la température en fonction du temps (JANY et BARBIER, 2008).

2-3-2. Extraction de l'ADN génomique à partir de la masse fromagère

L'extraction de l'ADN chromosomique à partir de la matrice du fromage *bouhezza*, a été effectuée selon le protocole proposé par LICITRA *et al.* (2007). Une masse de 10 g de fromage est mise en suspension dans 90 mL de solution stérile de citrate trisodique à 2% (p/v) à 45°C et homogénéisée au Stomacher (Stomacher[®] 400 lab blender, UK) pendant 5 min à haute vitesse. Un mL de l'homogénéisât du fromage est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. À chaque échantillon, 400 µL de tampon de lyse (20 mM de Tris HCl [pH 8], 2 mM de l'EDTA, 1,2% Triton X-100, 20 mg/mL de lysozyme, 10 µL/mL de mutanolysine à une concentration de 5U/mL) sont ajoutés après élimination du surnageant, puis incubés à 37°C pendant 1 heure. Après incubation, 25µL de protéinase K à une concentration de 20mg/mL et 200µL de tampon AL (DNeasy tissues kit; QUAGEN, France)

sont ajoutés et mélangés doucement, pour une deuxième incubation à 70°C pendant 30 min. (le Kit DNeasy[®] tissus contient les tampons : de lyse, AW2, AW1, AE, AL, et la colonne d'extraction).

Après cette incubation, 200µL d'éthanol absolu sont ajoutés à une température de 4°C et mélangés pour la précipitation de l'ADN. Le contenu de l'Eppendorf est versé dans la colonne d'extraction et centrifuger à 8000 rpm pendant 2 min.

La purification de l'ADN est effectuée selon les instructions de Kit (DNeasy tissus kit). Après la centrifugation, 500 µL de tampon AW1 sont ajoutés et centrifugés à 8000 rpm pendant 2 min. Le tube de collecte est transféré dans une nouvelle colonne, et 500µL de tampon AW2 sont ajoutés et centrifugés à 7000 rpm pendant 3 min.

La colonne est déposée dans un tube Eppendorf de 2 mL, et 200 µL de tampon AE sont ajoutés et après 2 min à température ambiante le tube est centrifugé à 8000 rpm pendant 2 min (c'est la première élution). Après une deuxième élution (même étapes que la 1^{ère} élution), les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2-3-3. Amplification de l'ADN génomique

L'amplification a été effectuée selon le protocole proposé par PARAYRE *et al.* (2007), la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), est amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles V3P3-GC-Clamp (5'-GCCCCGCCGCGC GCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTCGGGAGGCAGCAG-3') et V3P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Sigma, Italie). Ces amorces donnent des produits de PCR d'environ 233 paires de base. Le milieu réactionnel (50 µL) dans chaque tube de PCR est constitué de 40 µL de Mix PCR (tableau 5), et 10 µL de l'échantillon de l'ADN bactérien extrait à partir de la masse fromagère.

Tableau 5. Composition du milieu réactionnel pour PCR (Mix PCR).

Mix PCR	Quantité de chaque constituant par tube de PCR (µL)
H ₂ O	31,5
Tampon MgCl ₂ .	5
dNTPs (5mM)	2
Amorce V3P3-GC-C (100µM)	0,5
Amorce V3P2 (100µM)	0,5
Taq polymérase (5U/µL)	0,5 µL (2,5U)

L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (PTC-100TM, programmable thermal Controller). La réaction d'amplification consiste en une incubation à 94°C pendant 2 min, suivie de 35 cycles. Chaque cycle c'est la succession de trois étapes : 30s de

dénaturation à 95°C, 30s d'hybridation à 63°C et 1 min d'élongation à 72°C, suivie d'une extension finale de 5 min à 72°C, et à la fin de réaction la température se stabilise à 4°C.

2-3-4. Electrophorèse sur gel d'agarose

La pureté et la taille des produits de l'amplification ont été vérifiées par une séparation sur gel d'agarose, le gel est préparé par l'addition de 1,5 g d'agarose à 100 mL de tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X) (10,8 g/L de Tris-HCl, 0,93 g/L de l'EDTA, 5,5 g/L de l'acide borique, et le pH est ajusté à 8,3).

Le mélange est porté à ébullition pour faire fondre l'agarose, avant refroidissement, le gel doit être coulé. Cinq µL de l'amplifiât sont déposés dans les puits de gel recouvert par le tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X). La migration est réalisée sous une tension de 100V pendant 35 min dans une cuve de type Vary Gel (BIO-RAD). Et le 100-bp ADN Ladder (Fementas Life Science, Italie) est utilisé comme marqueur de taille.

Pour la coloration, le gel est incubé dans une solution de Bromure d'Ethidium à 2,5 µg/L pendant 15 min et les rincer pendant 5 min dans l'eau, puis observé sur la table Ultraviolet avec prise de photo.

2-3-5 Préparation du gel de polyacrylamide et analyses en TTGE (*Temporal emperature Gel Electrophoresis*)

Le gel utilisé est constitué d'un gel de séparation (Resolving) à 10% d'acrylamide et 7 M d'urée, et d'un gel de concentration à 8% d'acrylamide (Stacking) dans lequel sont déposés les échantillons à analyser (tableau 6).

Tableau 6. Composition des gels de séparation et de concentration.

	Resolving	Stacking
Acrylamide/bis 40% (37.5 :1).	6,25 mL	2,1 mL
TAE 50X (Tris-HCl 2M, Acide Acétique 1M, EDTA 50 mM).	0,625 mL	175 µL
Urée	10,5 g	/
Temed	25 µL	7 µL
Persulfate d'ammonium à 10%	250 µL	70 µL
H ₂ O distillée	10,25 mL	7,35 mL

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre où s'effectue la réaction de polymérisation (figure 5). Les monomères d'acrylamide vont polymériser sous forme de chaîne de polyacrylamide. Le N,N -méthylènebisacrylamide permettra la formation des pores dans le gel. Des radicaux libres provenant du persulfate d'ammonium stabilisés par le TEMED sont les catalyseurs de la réaction de polymérisation (CHAUMANDE, 2011).

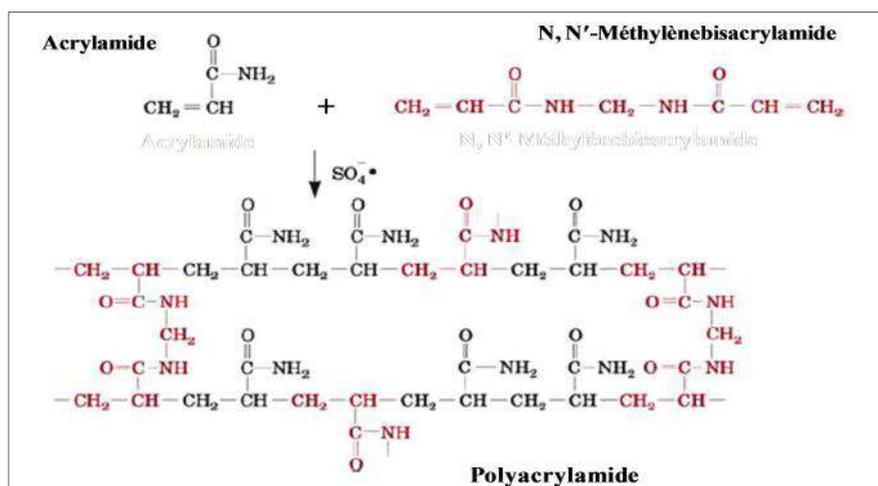


Figure 5. Formation du réseau de polyacrylamide dans un gel P.A.G.E. (CHAUMANDE, 2011)

Dix μL de l'amplifiât de chaque échantillon sont mélangés avec 5 μL de tampon de charge (0,05% bleu de bromophenol, 0,05% xylène cyanol, et 70% glycérol). Le mélange de chaque échantillon est alors déposé dans un puits du gel de concentration. Le marqueur qui a été utilisé contient des amplifiâts de 12 souches (tableau 7), 30 μL de marqueur sont déposés par puits. Le marqueur est obtenu à partir des laboratoires INRA-Agrocompus Rennes (France).

Tableau 7. Les souches utilisées comme marqueur pour la PCR-TTGE.

Souches	Volume de l'amplifiât.
1- <i>Lactobacillus plantarum</i> CNRZ211 ^T 2- <i>Lactobacillus fermentum</i> CNRZ209 ^T 3- <i>Enterococcus faecium</i> LMG 8149 4- <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 137 5- <i>Enterococcus faecalis</i> CNRZ137 13	13 μL
6- <i>Lactococcus lactis</i> CNRZ105 ^T 7- <i>Streptococcus thermophilus</i> CIP102303 ^T 8- <i>Corynebacterium moorparkenese</i> CIP107183 ^T 9- <i>Lactobacillus paracasei</i> LMG9192	15 μL
10- <i>Arthrobacterium nicotianae</i> CIP82.107 ^T 11- <i>Brevibacterium casei</i> CIP102111 ^T 12- <i>Propionibacterium cyclohexanicum</i> TL1365 ^T	19 μL
Tampon de charge	25 μL

Les analyses en *Temporal Temperature Gel Electrophoresis* (TTGE) ont été réalisées avec le système universel de détection de mutation (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA), et la migration est réalisée sous une tension de 41V pendant 16h, avec un gradient de température de 63°C à 70°C, à raison de 0,4°C.h⁻¹.

Une fois l'électrophorèse achevée et le gel supérieur de concentration écarté après démoulage, l'ADN est coloré par immersion du gel dans une solution de bromure

d'éthydiuim (0,6µg de bromure d'éthydiuim par mL de tampon TAE 1,25X), pendant 15 min. Le gel est ensuite immergé dans l'eau distillée pendant 30 min. Les bandes sont ensuite visualisées et photographiées par transillumination ultraviolette (E-Box 1000/26M, Euroclone, Siziano, Italie). Les bandes ensuite sont analysées pour identifier les espèces correspondantes, par comparaison aux bases des données développées par PARAYRE *et al.*, (2007), à l'aide du programme BioNumerics, version 4.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique). La base des données permet de comparer les bandes aux 54 espèces les plus fréquentes dans les fromages et les produits laitiers, qui appartenant aux 18 genres (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*).

Tableau 8. Les espèces de la base des données, selon PARAYRE *et al.* (2007).

1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	26. <i>Escherichia coli</i>
2. <i>Lactobacillus johnsonii</i>	27. <i>Bifidobacterium breve</i>
3. <i>Lactobacillus gasseri</i>	28. <i>Hafnia alvei</i>
4. <i>Lactobacillus fermentum</i>	29. <i>Corynebacterium variabile</i>
5. <i>Leuconostoc cremoris</i>	30. <i>Corynebacterium flavescens</i>
6. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31. <i>Bacillus pumilus</i>
7. <i>Staphylococcus equorum subsp. linens</i>	32. <i>Microbacterium gubbeenense</i>
8. <i>Enterococcus faecium</i>	33. <i>Kocuria varians</i>
9. <i>Lactobacillus brevis</i>	34. <i>Lactobacillus reuteri</i>
10. <i>Staphylococcus xylosus</i>	35. <i>Bifidobacterium longum</i>
11. <i>Lactobacillus helveticus</i>	36. <i>Lactobacillus paracasei</i>
12. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	37. <i>Lactobacillus casei</i>
13. <i>Lactobacillus crispatus</i>	38. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
14. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	39. <i>Lactobacillus zeae</i>
15. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	40. <i>Brevibacterium infantis</i>
16. <i>Enterococcus faecalis</i>	41. <i>Corynebacterium casei</i>
17. <i>Staphylococcus succinus</i>	42. <i>Arthrobacter nicotianae</i>
18. <i>S. gallolyticus subsp. macedonicus</i>	43. <i>Arthrobacter globiformis</i>
19. <i>Staphylococcus carnosus subsp. carnosus</i>	44. <i>Brachybacterium tyrofermentans</i>
20. <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	45. <i>Propionibacterium microaerophilum</i>
21. <i>S. carnosus subsp. carnosus</i>	46. <i>Brachybacterium alimentarium</i>
22. <i>Lactobacillus buchneri</i>	47. <i>Brevibacterium linens</i>
23. <i>Bacillus cereus</i>	48. <i>Propionibacterium acidipropionici</i>
24. <i>Bacillus licheniformis</i>	49. <i>Brevibacterium casei</i>
25. <i>Streptococcus thermophilus</i>	50. <i>Propionibacterium jensenii</i>
	51. <i>Propionibacterium thoenii</i>
	52. <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	53. <i>Propionibacterium cyclohexanicum</i>

3 Caractérisations physicochimiques

3-1 Détermination du pH et de l'acidité

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

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (pH-mètre GLP22, CRISON) à 0,01 unité de précision. Des quantités des échantillons de fromage *bouhezza* sont malaxées pour obtenir une pâte homogène. Après l'étalonnage du pH-mètre, l'électrode est placée directement dans la masse fromagère.

- Pour le dosage de l'acidité de fromage, une masse de 10 g de *bouhezza* est placée dans un récipient d'homogénéisation. Un volume de 40 mL de l'eau distillée à 60°C est ajoutée et mélangé à faible vitesse, et placé dans un Erlenmeyer ; le récipient d'homogénéisation est rincé deux fois par 30mL d'eau distillée et ajouté au mélange.

Le mélange est centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min. Après centrifugation le surnageant est placé dans une fiole jaugée et le volume est complété à 100mL par l'eau distillé (BARBANO, 1986).

Un volume de 50 mL est prélevé pour être titré par une solution de NaOH (0,1N) jusqu'au virage au rose, en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

- Expression des résultats

$$\text{Acidité titrable (\% en acide lactique)} = \frac{V_{\text{NaOH}} [\text{ml}] \times N [\text{mol/l}] \times 90,05 [\text{g/mol}]}{5}$$

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

N [mol/l]: normalité de solution de NaOH.

$90,05$ [g/mol]: la masse molaire de l'acide lactique.

3-2 Détermination de la matière sèche

La matière sèche correspond au poids du résidu restant après dessiccation du produit par étuvage à $100 \pm 2^\circ\text{C}$. La matière sèche est l'un des principaux paramètres de composition utilisé pour la caractérisation et la classification des fromages.

Deux grammes de fromage *bouhezza* sont pesés après homogénéisation de la pâte fromagère, les prises des essais sont mesurées à 10^{-4} g près et la matière sèche est exprimée en pourcentage pondéral par le restant après dessiccation. Nous avons effectué quatre déterminations par échantillon.

La dessiccation est réalisée dans une étuve à circulation d'air forcée (MEMMERT) à une température de $100 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures (MARSHALL, 1993).

3-3. Dosage du taux de matière grasse

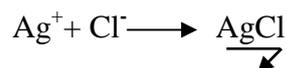
Le dosage de la matière grasse est réalisé selon la méthode de Van Gulick. Cette méthode est basée sur l'attaque acide des éléments du fromage (par H_2SO_4), excepté la matière grasse, puis centrifugation.

Trois grammes de fromage sont exactement pesés ($3,000 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$) dans un godet adapté au butyromètre, le godet est recouvert à ras avec de l'acide sulfurique (densité de 1,522) pour l'analyse du fromage. Les butyromètres sont placés dans un bain d'eau à $65 \pm 2^\circ\text{C}$, sous agitation pour aider à la dissolution du fromage. Quand l'attaque est terminée, on ajoute 1 mL d'alcool iso-amylique (3-méthyle, 1-butanol) (densité de 0,818 g/ml) et l'on complète avec H_2SO_4 jusqu'aux $4/5^{\text{ème}}$ de la tige. Après agitation, une centrifugation de 1350 rpm pendant 10 min est appliquée. La lecture est faite après passage de 5 min au bain d'eau à 65°C . Les butyromètres sont étalonnés en pourcentage pour un poids exact de 3 g. La manipulation est répétée deux fois pour le même échantillon.

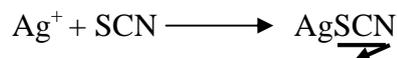
Le résultat est exprimé par la valeur moyenne des deux mesures.

3-4. Dosage du taux de chlorures

Pour la détermination de la teneur en chlorures nous avons utilisé la méthode de Volhard (norme : AOAC, 1997). Cette méthode permet le dosage des chlorures totaux et le résultat est exprimé en chlorure de sodium. On procède à une minéralisation de l'échantillon par l'acide nitrique concentré, et à une défécation de la matière organique qui reste par le permanganate de potassium. En présence d'un excès de nitrate d'argent, les chlorures de l'échantillon précipitent en chlorure d'argent selon la réaction suivant:



L'excès d'ion d'argent est dosé par une solution de thiocyanate de potassium (KSCN) en présence d'indicateur de fin de réaction (alun de fer).



L'alun de fer et l'ammonium forme avec le thiocyanate un complexe rouge (complexe ferrithiocyanique).



Pour la détermination du taux de chlorures dans le fromage, une masse de 3 g de *bouhezza* est pesé dans un Erlenmeyer, et 25mL de $AgNO_3$ (0,1M) y sont ajoutés ; ce qui est suffisant pour complexer la totalité des ions Cl^- , après addition de 10mL d'acide nitrique (HNO_3 , 69%), la solution est chauffée et pendant l'ébullition, 15mL de $KMnO_4$ (5% p/v) sont ajouté en 3 fois (5mL à chaque fois). Lorsque la solution devient jaune claire on la refroidit et après filtration le reste de $AgNO_3$ est titré par un solution de thiocyanate en

présence de 2mL de solution concentré de l'alun de fer. La manipulation est répétée deux fois pour le même échantillon.

La teneur en chlorure est donnée par :

$$\text{Chlorure de Sodium(\%)} = [\mathbf{B - T}] \times \mathbf{5,85/M}$$

D'où : B = volume de thiocyanate utilisé pour l'essai à blanc ;

T= volume de thiocyanate utilisé pour la titration ;

M= prise d'essai en gramme.

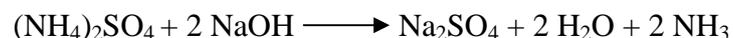
Elle est exprimée par la moyenne des deux mesures faites successivement sur un échantillon donné.

3-5. Dosage de l'azote total

La détermination de la matière azotée est effectuée selon la méthode de Kjeldahl. Cette méthode est fondée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique en présence d'un catalyseur de minéralisation. L'ammoniac est distillé puis fixé dans une solution acide, après alcalisation à l'aide d'une base forte (NaOH), la solution est ensuite titrée par de l'acide sulfurique.

Les échantillons de fromage *bouhezza* (1g) sont introduits dans des tubes de minéralisation avec 20 mL de l'acide sulfurique (densité de 1,84 g/ml), 12 g de sulfate de potassium et 1mL de solution du sulfate de cuivre à 5% (CuSO_4). Ils sont minéralisés sur une rampe avec une augmentation de température jusqu'à 420°C pendant 3h. Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le produit essentiel de la minéralisation.

Au cours de la distillation (appareil DÜCHI Distillation Unit K-350), une base forte (NaOH, 40%) est ajoutée en volume égal au volume d' H_2SO_4 pour la faire réagir selon la réaction suivante :



L'hydroxyde d'ammonium formé (NH_4OH) est entraîné par la vapeur d'eau et récupéré dans un vase de titrage contenant 50mL d'une solution d'acide borique (acide borique à 4%). Le borate d'ammonium formé $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ fait augmenter le pH de la solution qui est ensuite titrée par de l'acide chlorhydrique (0,1M).

La manipulation est répétée deux fois pour le même échantillon et la moyenne des deux valeurs obtenue donne la teneur en azote du fromage.

Les résultats sont exprimés en g d'azote total (NT) pour 100 g de fromage selon la formule suivante :

$$\mathbf{NT = (V_1 - V_0) \times 0,14 \times 10 / P}$$

Taux de matière azotée total (g/100 g fromage) = 6,38 x NT

Avec

V_1 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage de l'échantillon en mL ;

V_0 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage du blanc en mL ;

P : masse de l'échantillon du fromage en g ;

6,38 : facteur protéique (ADLER-NISSEN, 1986).

3-6. Dosage de la fraction azotée soluble à pH 4,6

La protéolyse des fromages est souvent déterminée par le dosage de l'azote soluble à pH 4,6. Le dosage de la fraction azotée non caséique (ANC) consiste en une séparation par précipitation de la caséine au point isoélectrique et filtration puis dosage de l'azote du filtrat par la méthode de Kjeldahl.

L'échantillon de fromage (0,75g) est solubilisé dans 50mL de solution d'acide acétique (0,25M acétate de sodium, 0,2M NaCl, et 0,025M $CaCl_2$) et homogénéisé pendant 30 secondes à faible vitesse. Après homogénéisation, la solution est filtrée à travers du papier Whatman (2V) dans un tube de minéralisation. Le dosage de l'azote du filtrat est effectué par la méthode de Kjeldahl (BYNUM et BARBANO, 1985). La manipulation est répétée deux fois pour chaque échantillon.

Les résultats sont exprimés en pourcentage en fonction de l'azote total.

3-7. Dosage de la fraction azoté soluble à 12 % de TCA

Le taux d'azote non protéique (ANP) est déterminé après précipitation des protéines du fromage avec une solution d'acide trichloroacétique (T.C.A) suivi d'une filtration.

L'échantillon de fromage (1,5g) est solubilisé dans 45mL de solution d'acide trichloroacétique (12% p/v) et homogénéisé pendant 30 secondes à faible vitesse. Après homogénéisation, la solution est filtrée à travers du papier Whatman (n°42) dans un tube de minéralisation. Le dosage de l'azote du filtrat est effectué par la méthode de Kjeldahl (BYNUM et BARBANO, 1985).

La manipulation est répétée deux fois pour chaque échantillon et l'azote non protéique est exprimé par la moyenne des valeurs issues des deux mesures.

4. Caractérisation de la protéolyse

4-1. Extraction des fractions azotées

Pour la caractérisation de la protéolyse dans le fromage *bouhezza* nous avons procédé à l'extraction de quatre fractions azotées (les fractions soluble et insoluble à pH 4,6 et les fractions soluble et insoluble dans 70% d'éthanol), pour les analyser par séparation

électrophorétique (fraction insoluble à pH 4,6) et par séparation chromatographique (soluble à pH 4,6 ; soluble et insoluble dans 70% d'éthanol) comme le montre la figure 6.

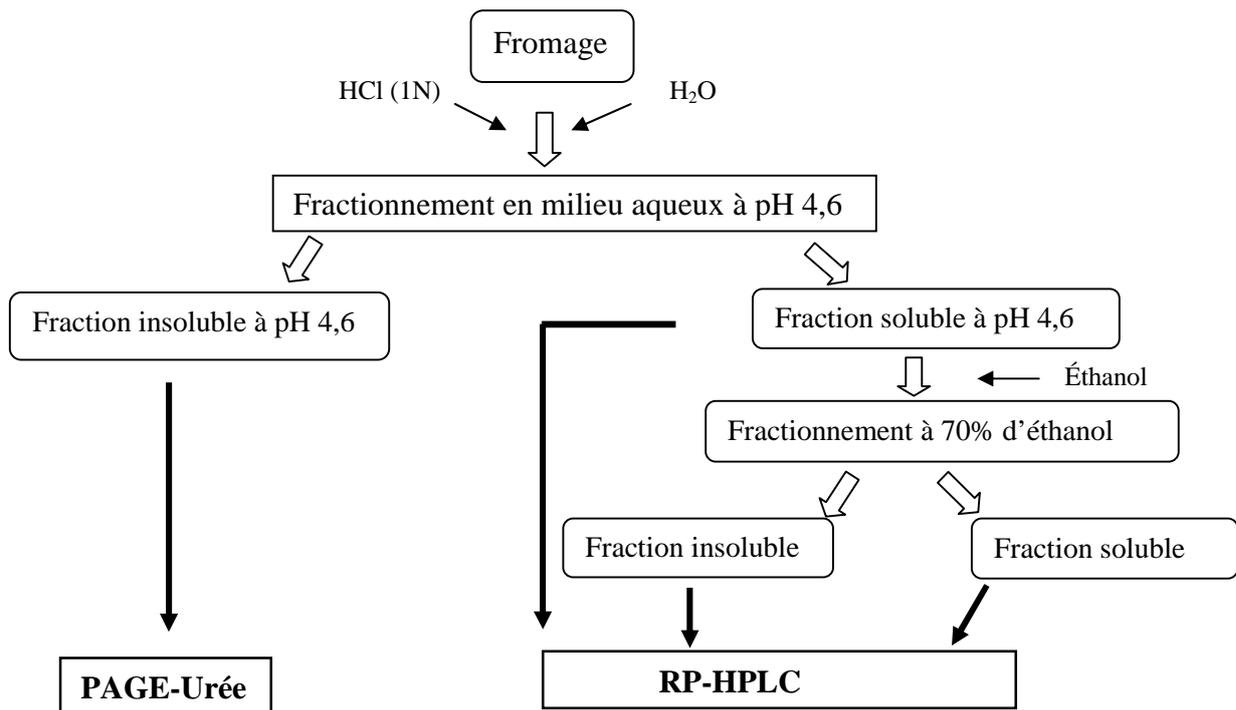


Figure 6. Fractionnement des matières azotées en vue des analyses par PAGE-Urée et par RP-HPLC.

4-1-1. Extraction des fractions azotées solubles et insolubles à pH 4,6

Pour l'extraction des deux fractions soluble et insoluble à pH 4,6, le protocole proposé par FALLICO *et al.* (2004) est utilisé. Une masse de 25 g de fromage est homogénéisée avec 50mL d'eau distillé au Stomacher, pendant 10 min. Après homogénéisation, le pH est ajusté par addition de l'HCl (1N) jusqu'à stabilisation à 4,6 après 30min. Les échantillons sont chauffés au bain-marie pendant 1h à 40°C et une centrifugation pendant 30min à 4290 rpm à 4°C est nécessaire pour la séparation des protéines insolubles. Le surnageant est filtré à travers un papier Whatman N°113, et la fraction insoluble (culot) est resuspendue dans l'eau distillée pour être lyophilisée.

La fraction insoluble à pH 4,6 est lyophilisée dans un appareil de marque Christ® Alpha 1-4 LD, pendant 36h à une pression de 0,1 mbar, à -62°C. Les lyophilisats obtenus sont conservés dans des flacons bien séchés jusqu'à leur utilisation.

Seulement la fraction insoluble a été utilisée pour la séparation en PAGE-Urée. La fraction soluble est congelée à -20°C et conservée jusqu'à son utilisation, pour le fractionnement à l'éthanol en vue d'une analyse par HPLC.

4-1-2. Extraction des fractions azotées solubles et insolubles dans 70% d'éthanol

La fraction soluble à pH 4,6 qui était conservée à l'état congelée est récupérée en vue d'être analysée par HPLC et pour être fractionnée dans l'éthanol avant son analyse.

La partie destinée à la séparation en deux fractions (selon le protocole proposé par LYNCH *et al.* (1996)), soluble et insoluble dans l'éthanol à 70% est traitée comme suit :

25 mL de chaque échantillon sont additionnée à 58,3 mL d'éthanol pur, pour l'obtention d'une solution à 70% d'éthanol (v/v). Après 30min à température ambiante la solution est centrifugée pendant 30min à 4290 rpm à une température de 20°C. La fraction insoluble est mise en suspension dans l'eau distillée et le surnageant (fraction soluble en éthanol) est filtré à travers du papier Wathman N°1. L'éthanol est éliminé au Rotavapor (ROTAVAPOR[®] R-3000, BUCHI, Switzerland) à une température de 30°C pendant presque 30min.

Les trois fractions (soluble à pH 4,6, soluble et insoluble dans l'éthanol à 70%) sont congelées dans des flacons avant d'être lyophilisées à l'aide de l'appareil Christ[®] Alpha 1-4 LD, pendant 36h à une pression de 0,1 mbar, à -62°C. Les lyophilisats obtenus sont conservés dans des flacons bien séchés jusqu'à leur utilisation.

4-2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée (PAGE-Urée)

Nous avons réalisé la séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide (P.A.G.E).

L'électrophorèse PAGE-Urée est une méthode particulièrement adaptée pour la séparation des caséines qui sont difficilement séparables en conditions natives. L'urée à forte molarité élimine les liaisons faibles, plus particulièrement les liaisons hydrogènes et hydrophobes (DAMERVAL *et al.*, 1993).

4-2-1. Préparation du gel de migration

Nous avons utilisé un gel de polyacrylamide selon la méthode d'ANDREWS (1983), composé d'une partie supérieure dite gel supérieur ou de concentration (4% (p/v) d'acrylamide), qui permet de concentrer les protéines, et d'une partie inférieure dite gel de séparation (12% (p/v) d'acrylamide), qui permet la séparation des protéines. La composition des gels utilisés est indiquée dans le tableau 9.

Après avoir assemblé les plaques de verre sur l'appareil à gels, on prépare la solution de gel de séparation en utilisant les ingrédients décrits dans le tableau 9, puis on homogénéise la solution, et on coule immédiatement entre les deux plaques. On laisse suffisamment d'espace pour le gel de concentration (la longueur des dents du peigne plus presque 1cm), et on recouvre avec quelques mL d'eau distillée.

Tableau 9. Composition des gels de polyacrylamide en milieu urée.

	Gel de séparation	Gel de concentration.
Solution tampon de gel de séparation	52,5mL	/
Solution tampon de gel de concentration	/	45mL
Solution d'acrylamide 40% (p/v)	22,5mL	5mL
Bis-acrylamide	0,375g	0,1g
Temed	37,5 μ L	25 μ L
APS (Ammonium Persulfate)	282 μ L	300 μ L

- La composition des solutions tampons pour la préparation des gels (de séparation et de concentration) est mentionnée dans le tableau suivant.

Tableau 10. Composition des solutions tampons des gels de concentration et de séparation.

	Solution tampon de gel de séparation.	Solution tampon de gel de concentration.
Tris	64,30g	8,30g
Urée	385,7g	300g
H ₂ O	Complété à 1L	Complété à 1L
pH final (ajusté par solution d'HCl).	8,9	7,6

Lorsque la polymérisation est terminée, et après avoir éliminé l'eau distillée et placé le peigne pour créer des puits, on prépare le gel supérieur qu'on coule au-dessus du gel inférieur en évitant la formation des bulles d'air.

Après polymérisation du gel supérieur, on enlève le peigne et on recouvre le gel avec le tampon de migration (3g/L de Tris, 14,6g/L de Glycine et le pH est ajusté à 8,4) ; la cuve de migration est aussi remplie de tampon de migration.

4-2-2. Préparation et dépôt des échantillons

Pour la préparation des échantillons selon la méthode d'ANDREWS (1983), 10mg du lyophilisat (fraction insoluble à pH 4,6), sont mélangés avec 1mL de tampon de charge (7,5g/L Tris, 490g/L urée, 7mL/L de 2-mercaptoéthanol), le mélange est homogénéisé jusqu'à solubilisation complète du lyophilisat avec ajout de 10 μ L de bleu de bromophénol. Ensuite 15 μ L de chaque échantillon sont déposés dans les puits du gel de concentration. De la même manière on dépose 10 μ L de caséine bovine du lait cru (CN) comme marqueur dans un puits.

4-2-3. Migration et révélation

La migration est réalisée en appliquant un courant de 280V pendant 20min jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le début de gel de concentration, puis de 300V pendant

16h, la migration est réalisée à une température de 12°C assuré par un système d'écoulement réfrigérant en continu (Julabo F25-HL).

Après démoulage, le gel de concentration est écarté et le gel de séparation est coloré selon la méthode de BLAKESLEY et BOEZI (1977), pendant 1h dans une solution de bleu de Coomassie G-250 (Coomassie G-250 à 0,2% (p/v), H₂SO₄ 1M, KOH 1M, et TCA 12% (p/v)). La décoloration du gel s'effectue sous agitation douce pendant 1 jour dans des solutions (30% (v/v) de méthanol et 7,5 % (v/v) acide acétique), renouvelées plusieurs fois.

L'identification des bandes se fait par comparaison au marqueur des caséines natives et à l'aide de la bibliographie.

4-3. Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC)

4-3-1. Principe

La chromatographie liquide haute performance est une méthode de séparation des constituants d'un mélange (même très complexe). Un fluide appelé phase mobile, parcourt une colonne appelée phase stationnaire. Cette colonne peut contenir des granules poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne ou il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne (Figure 7) (SUTTON *et al.*, 1997).

Les constituants du mélange, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. Il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi séparés (SNYDER *et al.*, 2010).

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un chromatogramme. En effet, au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

La chromatographie utilisée est appelée « à phase inverse » car la phase stationnaire est majoritairement composée des billes de silice greffée par des chaînes linéaires (de 8 ou 18 atomes de carbone). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (acétonitrile, méthanol, eau...). Dans ce cas ce sont les composés polaires qui seront élués en premier (DRIAD, 2009).

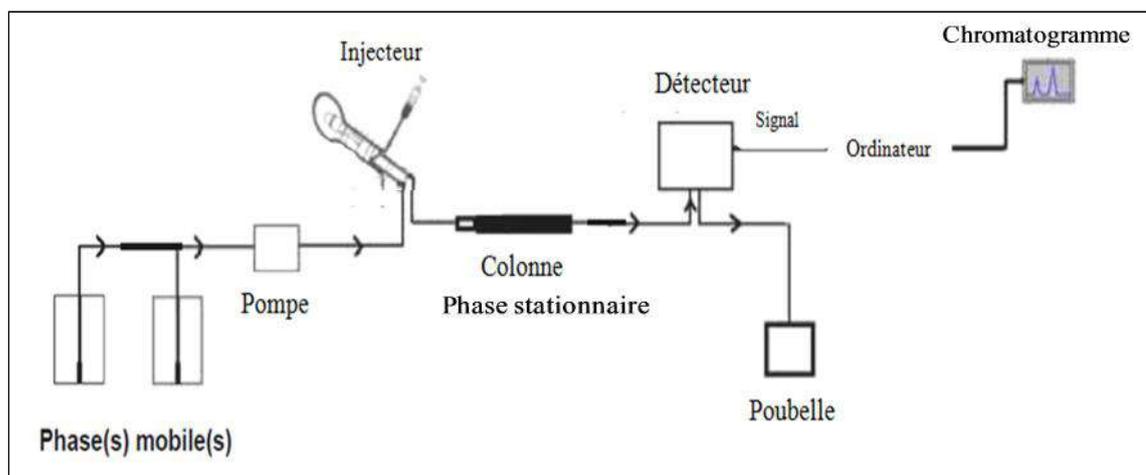


Figure 7. Schéma d'une chaîne HPLC (TOZLOVANU, 2008).

4-3-2. Description du système HPLC

Pour l'analyse des échantillons nous avons utilisé l'appareil Waters 2695 Separations Module (USA),

La phase mobile alimente le chromatographe en permanence : elle est délivrée dans le système par une pompe. Les composés à séparer, en suspension dans le solvant sont prélevés grâce à une seringue du système auto-échantillonnage. Les molécules sont entraînées par la phase mobile vers la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire.

Nous avons utilisé une colonne C18, avec des dimensions 250mm de longueur et 4,6mm de diamètre (Analytica, Chine).

Un détecteur à l'ultraviolet, de type Waters 2487 Dual Absorbance Detector (USA), suit en permanence l'élution des composés et le signal obtenu est enregistré au niveau de l'ordinateur sous forme de chromatogramme.

4-3-3. Préparation des échantillons et des phases mobiles pour l'RP-HPLC

La phase mobile utilisée est un mélange de deux solvants (A et B) ;

- Solvant A : 0,1% (v/v) de l'acide trifluoroacétique (TFA, sequencing grade; Sigma St. Louis, USA), dans de l'eau filtrée sur système Millipore (Milipore Direct-Q® UV3, France).

- Solvant B : 0,1% (v/v) de l'acide trifluoroacétique (TFA), dans l'Acétonitrile HPLC-grade (CARLO ERBA Reagenti-Spa, Italie).

Pour la préparation des échantillons, 10 mg de lyophilisat de chaque type de fraction sont solubilisés dans 1 mL de solution A (0,1% TFA). Après homogénéisation, les échantillons sont filtrés manuellement à travers un filtre MILLIPORE 0,45 µm, et placés dans des flacons de 1,5mL pour l'auto-échantillonnage.

4-3-4. Paramètres d'analyse en HPLC

La composition de la phase mobile varie au cours de l'analyse d'un solvant A à un solvant B dans des proportions déterminées au préalable comme il est indiqué par HAYALOGLU *et al.* (2004).

Le gradient est le suivant : Les échantillons ont été élués au début avec 100% de solution A pendant 5 min, et avec un gradient de 0% à 50% (v/v) de solvant B pour les 55 min suivantes. Ce gradient est maintenu pendant 6 min, suivi d'un gradient linéaire de 50% à 95% de solvant B (v/v) pendant 4 min. Finalement la colonne est rincée avec 95% (v/v) de solvant B pendant 10 min et équilibrée avec 100% de solvant A pendant 25 min. Le temps de séparation pour chaque échantillon est de 70min (105min par échantillon avec rinçage et calibrage de la colonne).

La détection est réalisée à une longueur d'onde de 214 nm. La phase mobile est délivrée par la pompe à un débit de 0,75µL/mn. Le volume d'échantillon prélevé et injecté automatiquement dans le système est de 40µL.

Résultats et Discussion

1- Caractéristiques microbiologiques

1-1 Détection des bactéries pathogènes

Les agents pathogènes, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, et *Escherichia coli*, constituent le risque le plus significatif vis-à-vis de la sécurité sanitaire des fromages (DE BUYSER *et al.*, 2001; LEUSCHNER et BOUGHTFLOWER, 2002).

Le tableau suivant présente les résultats de détection des trois bactéries pathogènes dans les échantillons de *bouhezza* des fermes par le système BAX[®].

Tableau 11. Présence ou absence des trois bactéries pathogènes dans *bouhezza* des fermes.

Germes	Ech f1	Ech f2	Ech f3	Ech f4	Ech f5	Ech f6
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence (-)					
<i>E-Coli O157: H7</i>	Absence (-)					
<i>Salmonella</i>	Absence (-)					

Les trois bactéries pathogènes (tableau 11) sont absentes dans les six échantillons de *bouhezza* issue de différentes fermes.

Listeria monocytogenes est une bactérie à gram positif, non sporulée, anaérobie facultative et psychrotrophe (GUIRAUD, 2003), elle est capable de tolérer les conditions environnementales variables dans les établissements de transformation des produits laitiers, de croître à un pH de 4,4 à 9,4 et de proliférer en présence de concentration de NaCl allant jusqu'à 10% (AUGUSTIN et CARLIER, 2000). En général, les souches d'*E. coli* ne tolèrent pas des valeurs basses de pH, mais dans le cas d'*E. coli O157: H7*, elle peut croître à un pH de 4,5 dans les milieux ajustés avec l'HCl, mais ne résiste pas si le pH est ajusté avec de l'acide lactique. Elle ne se développe pas dans les fromages à des valeurs de pH égales ou inférieures à 5,4 (FOX *et al.*, 2000).

Selon les résultats de MEDJOUJ ¹ (en cours), l'analyse par système BAX[®] de trois fabrications de *bouhezza* au lait cru de chèvre, avec une durée de maturation de 50 jours pour deux d'entre elles et de 72 jours pour la troisième fabrication, et de deux échantillons de ferme (Tébessa et Ain Fakroun) a démontrée l'absence des trois bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *E-Coli O157: H7*). D'après AISSAOUI ZITOUN ² (en cours), les trois bactéries pathogènes sont absentes dans deux fabrications de *bouhezza* au lait cru de vache pendant 70 jours de maturation et aussi dans quatre échantillons de ferme

¹ Thèse de doctorat en cours.

² Thèse de doctorat en cours.

(Ain Fakroun). Les travaux de AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b) indiquent l'absence des trois pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *E-Coli O157: H7* et *Salmonella*) dans le biofilm de surface des deux *Chekouates* préparées par deux peaux des chèvres, avant et après contact avec *Lben*, et ceci après analyse par système BAX®.

AZIZI et KERTICHE (2009), ont constaté l'absence des *Salmonella* dans deux fabrications du *bouhezza* après 64 jours de maturation, et selon les résultats de RACHEF (2006), les *Salmonella* sont absentes dans six échantillons de *bouhezza* des fermes après dénombrement sur milieu sélectif.

GENIGEORGIS *et al.* (1991) ont évalué la capacité de croissance de *L. monocytogenes* dans 24 types des fromages commercialisés, et ont trouvé que les fromages qui favorisent la croissance de cette espèce incluraient les fromages *Hispano*, *Ricotta*, *Teleme*, *Brie*, *Camembert* et le *Cottage* (gamme de pH 4,9 à 7,7), et les fromages qui ne favorisent pas la croissance et qui entraînant la mort progressive de *L. monocytogenes* incluraient les fromages *Cotija*, *Creme*, *Bleu*, *Monterey Jack*, *Suisse*, *Cheddar*, *Colby*, *String*, *Provolone*, *Monstre*, *Feta* et *Kasseri* (gamme de pH, 4,3 à 5,6).

L'effet du pH sur la survie des pathogènes en fromage est critique, par exemple les *Salmonella* meurent dans le fromage *Cheddar*, et leur charge diminue de 10^5 UFC/g jusqu'à 0 UFC/g pendant 80 jours dans l'intervalle de pH de 5 et 5,23 mais à pH 5,7 elles restent viables (FOX *et al.*, 2000).

L'absence des trois bactéries pathogènes dans *bouhezza*, fabriqué à partir de lait cru n'ayant subi aucun traitement thermique peut être expliquée par l'effet des conditions physicochimiques de la masse fromagère défavorable à leurs croissance, principalement le pH très faible, et probablement aussi à l'effet des interactions des microorganismes de l'écosystème créé pendant l'affinage dans la '*chekoua*', surtout la présence des bactéries lactiques indigènes comme flores majoritaires, qui sont caractérisées par leur énorme potentiel antimicrobien (HOLZAPFEL *et al.*, 1995 ; SCHNÜRER et MAGNUSSON, 2005 ; LEROY et DE VUYST, 2010).

Donc d'un point de vue hygiénique microbien, *bouhezza* des fermes pourrait être considéré comme un fromage sain.

1-2 Dénombrement des principales flores

La numération des différents groupes microbiens du *bouhezza* des fermes est présentée dans le tableau 12.

Tableau 12. Dénombrement des principales flores des six échantillons de *bouhezza* (en UFC/g).

Flores recherchées	Echantillons					
	Ech f1	Ech f2	Ech f3	Ech f4	Ech f5	Ech f6
Flore totale mésophile	$9 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^4$
Coliformes totaux	$<1 \cdot 10^1$					
Coliformes fécaux	$<1 \cdot 10^1$					
Moisissures	$5,6 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^5$	$5,3 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^5$	$<10 \cdot 10^2$	$<10 \cdot 10^2$
Levures	$<10 \cdot 10^2$					
Lactobacilles						
À 30°C	$5,1 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^5$
À 42°C	$1,3 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$
Streptocoque lactique						
À 30°C	$1,3 \cdot 10^8$	$9,6 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^4$
À 42°C	$2 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^6$	$8,8 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^4$

1-2-1. Flore aérobie mésophile totale

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale du *bouhezza* des fermes cultivée sur le milieu PCA est élevé, avec des valeurs entre 10^7 et 10^8 UFC/g pour les échantillons de 45 et 60 jours d'affinage, en notant toutefois que les échantillons Ech f5 et Ech f6 présentent les charges les plus faibles $1,4 \cdot 10^6$ UFC/g et $5,3 \cdot 10^4$ UFC/g, respectivement. Ces résultats sont assez faibles par rapport à ceux trouvés par AISSAOUI ZITOUN (2004), dans un échantillon de ferme à Ain Fakroun à 45 jours d'affinage (10^9 UFC/g), et aussi à ceux trouvés par RACHEF (2006), dans trois échantillons des fermes (d'Ain Fakroun, Ain Baida et de Batna) à 15 jours de fabrication ($6 \cdot 10^8$ UFC/g, $4 \cdot 10^8$ UFC/g et $2 \cdot 10^9$ UFC/g, respectivement).

Selon les résultats de AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011a), *bouhezza* de fabrication est caractérisé par une flore totale très élevée de 10^{11} UFC/g, pendant les deux premières semaines suivie par une chute jusqu'à 10^8 UFC/g, avec une corrélation très significative entre le nombre de la flore totale et les valeurs du pH. Avec l'ajout de lait cru à partir de la huitième semaine, la flore totale augmente et atteint 10^{10} UFC/g, et après deux semaines se stabilise autour de 10^8 UFC/g. AZIZI et KARTICHE (2009), ont mentionné que la charge microbienne totale de *bouhezza* de fabrication au lait de vache variait entre $8,4 \cdot 10^7$ UFC/g et $7,5 \cdot 10^8$ UFC/g durant les neuf semaines de fabrication. Les différences de charge en flore totale de *bouhezza* de fabrication rapportées par AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006), AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011a) (entre 10^8 UFC/g et 10^{11} UFC/g), ont été expliquées par la charge

microbienne des matières premières, principalement *Lben*, AISSAOUI ZITOUN (2004) a estimé que le *Lben* est caractérisé par une charge en flore totale de $3,3.10^{11}$ UFC/g.

Selon SERHAN (2009), le *Darfiyeh* (fabriqué à partir du lait cru de chèvre et affiné dans peau de chèvre) est caractérisé par une charge en flore total entre 10^6 et 10^9 UFC/g pendant les deux mois de fabrication.

Nos résultats montrent que *bouhezza* des fermes est caractérisé par une flore totale importante et non négligeable, mais qui est cependant plus faible dans les deux échantillons les plus âgés, probablement en raison de l'effet de piment rouge '*kalb el serdouk*'.

1-2-2. Coliformes totaux

Dans les six échantillons de *bouhezza*, la charge en coliformes totaux est moins de 10 UFC/g, ces résultats sont largement mineurs par comparaison avec les résultats de AISSAOUI ZITOUN (2004), mentionnés dans un échantillon de ferme d'Ain Fakroun (charge inférieure à 10^3 UFC/g).

AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006), ont trouvé dans *bouhezza* de fabrication pendant 70 jours une variation de cette flore entre 10^3 UFC/g et 10^6 UFC/g, alors que les résultats de AZIZI et KERTICHE (2009) se situent entre 10^2 UFC/g et 10^4 UFC/g, dans une fabrication de 64 jours.

La charge élevée en coliformes totaux dans la fabrication de AISSAOUI ZITOUN (2004) a été expliquée par la qualité microbiologique du *Lben* de fabrication utilisé, qui contient environ 8.10^6 UFC/g des coliformes totaux, mais après quatre jours de fabrication cette flore a été réduite jusqu'à 10^3 UFC/g. Cette diminution est expliquée par la réduction de pH et le salage de la masse fromagère.

Dans le *Cabrales*, un fromage bleu Espagnol fabriqué à partir de lait cru, la charge en coliformes totaux est réduite rapidement de 10^5 UFC/g à presque 10 UFC/g en moins de deux semaines, ce qui est expliqué par la diminution rapide du pH (FOX *et al.*, 2000).

1-2-3. Coliformes fécaux

La même chose pour les coliformes fécaux, leur nombre dans les six échantillons est inférieur à 10 UFC/g, ces résultats sont très inférieurs à ceux mentionnés par RACHEF (2006), sur trois échantillons des fermes (moyenne de $6,2.10^2$ UFC/g).

Selon les résultats de TOUATI (2008), dans *bouhezza* de fabrication, la charge en coliformes fécaux est d'environ 10^2 UFC/g, et après 50 jours de fabrication leur nombre est réduit à moins de 10 UFC/g. Dans *Montasio*, fromage Espagnol à base de lait cru de chèvre, les coliformes fécaux sont d'environ 10^2 UFC/g à une semaine et moins de 10 UFC/g après deux mois d'affinage (MARINO *et al.*, 2003).

La charge très faible en coliformes totaux et fécaux dans les six échantillons, est due probablement à la faible charge microbiologique de *Lben* de fabrication, ou à l'effet des conditions physicochimiques de la masse fromagère (principalement le pH et le taux de sel).

1-2-4. Lactobacilles

Les numérations des lactobacilles dans les six échantillons de *bouhezza* sont relativement importantes, le nombre des mésophiles est entre 10^7 UFC/g et 10^8 UFC/g, et des thermophiles est entre 10^5 UFC/g et 10^7 UFC/g, à l'exception du sixième échantillon qui présente une charge de 3.10^5 UFC/g et 2.10^4 UFC/g, respectivement. Nous remarquons que le nombre des Lactobacilles mésophiles est un peu plus important par rapport à celui des thermophiles, et les charges des échantillons Ech f5 et Ech f6 sont relativement plus faibles.

Les lactobacilles constituent la majorité des bactéries lactiques indigènes présentes dans les fromages (MANNU *et al.*, 2000). Dans le fromage *Darfiyeh*, le nombre de lactobacilles mésophiles est d'environ 10^7 UFC/g, et leur nombre est plus élevé que celui des lactobacilles thermophiles (SERHAN *et al.*, 2009).

1-2-5. Streptocoques lactiques

Des niveaux élevés de population en streptocoques lactiques mésophiles et thermophiles sont observés dans les six échantillons de *bouhezza*, leur charge est un peu similaire à celles des lactobacilles, et les mésophiles sont relativement plus élevés que les thermophiles, mais les deux échantillons les plus âgés présentent les charges les plus faibles, 10^5 UFC/g pour l'échantillon Ech f5, et 10^4 UFC/g pour l'échantillon Ech f6.

D'après AISSAOUI ZITOUN (2004), le nombre des streptocoques lactiques mésophiles dans un échantillon de ferme d'Ain Fakroun est de $3,1.10^6$ UFC/g et les résultats donnés par RACHEF (2006), montrent que le nombre des streptocoques lactiques mésophiles est d'environ 10^6 UFC/g pour trois échantillons des fermes. *Bouhezza* de fabrication est caractérisé par des charges en streptocoques lactiques mésophiles entre 10^6 UFC/g et 10^7 UFC/g, selon AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006) et AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011a). Dans le *Darfiyeh* les charges en streptocoques lactiques thermophiles varient entre 3.10^5 UFC/g et 2.10^6 UFC/g (SERHAN *et al.*, 2009).

Les bactéries lactiques, dont les lactobacilles et les streptocoques lactiques, sont les constituants majeurs de la microflore du fromage *bouhezza*.

La présence des lactobacilles et des streptocoques lactiques dans le fromage *bouhezza* est bénéfique, ces bactéries sont dotées de systèmes protéolytiques complexes, qui dégradent les protéines extra cellulaires afin d'assurer leurs besoin pour la croissance (KAWAI *et al.*, 1999 ; VASILJEVIC *et al.*, 2005). Selon l'âge des cellules bactériennes et les conditions physiologiques défavorables, les bactéries lactiques peuvent être autolysées (LORTAL et

CHAPOT-CHARTIER, 2005), ce phénomène est probablement responsable de la diminution de la charge bactérienne dans les deux échantillons de 75 jours et de 120 jours de maturation (Ech f5 et Ech f6). Après la lyse des bactéries lactiques, des enzymes intracellulaires sont libérées dans le caillé et peuvent ainsi intervenir par leur activité protéolytique et lipolytique dans la maturation de la pâte fromagère (CROW *et al.*, 1995 ; LORTAL et CHAPOT-CHARTIER, 2005).

1-2-6. Levures et moisissures

Le dénombrement de la flore fongique dans les six échantillons des fermes, permet de constater que la charge des moisissures est plus importante que celles des levures (moins de 100 UFC/g dans les six échantillons), et les deux échantillons les plus âgés (Ech f5 et Ech f6) présentent la charge la plus faible en moisissures.

Ces résultats sont inférieurs par rapport aux résultats de Aissaoui Zitoun (2004), dans un échantillon à 45 jours d'affinage issu d'une ferme de Ain Fakroun (10^7 UFC/g). Dans *bouhezza* fabriqué par AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006) à 70 jours de fabrication le nombre de cette flore (levure et moisissures) est d'environ 2.10^4 UFC/g.

La flore fongique peut avoir un rôle important dans la protéolyse, la lipolyse et la désacidification de la masse fromagère, cependant la charge fongique dans *bouhezza* est très largement inférieure que celle des bactéries lactiques. La charge élevée en flore lactique et l'effet des ajouts de *Lben* et/ou lait cru en continue permettent d'expliquer les valeurs du pH acide (environ 4 unités), et la restriction de l'activité de désacidification de la flore fongique.

1-3 Identification par PCR-TTGE

La TTGE est une excellente méthode pour décrire les espèces bactériennes dominantes dans un écosystème laitier (LAFARGE *et al.*, 2004 ; JANY et BARBIER, 2008). Cette technique donne des indications sur les populations bactériennes présentes au niveau de 1% de la flore totale, cette méthode pourrait être utilisée pour différencier les fromages selon leur technologie, leur origine ou leurs caractéristiques régionales (OGIER *et al.*, 2002). Les profils de TTGE pour les écosystèmes laitiers sont relativement simples (moins de dix bandes) par comparaison avec d'autres écosystèmes (sol, appareil digestif ...) (OGIER *et al.*, 2002 ; 2004).

1-3-1. Qualité des amplifiats du PCR

Afin de vérifier la qualité de l'ADN amplifié, nous avons fait migrer les amplifiats sur gel d'agarose à 1,5%, la figure 8 représente les résultats de cette migration.

Nous observons que dans les amplifiats des six échantillons, la migration permet de distinguer une seule bande, ce qui signifie que l'extraction et l'amplification a été bien faite.

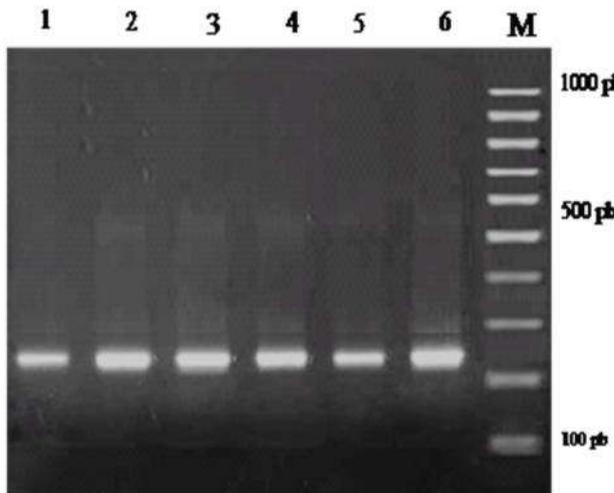


Figure 8. Profil électrophorétiques des fragments de l'ADN bactériens amplifiés et du marqueur de taille sur gel d'agarose à 1,5%.

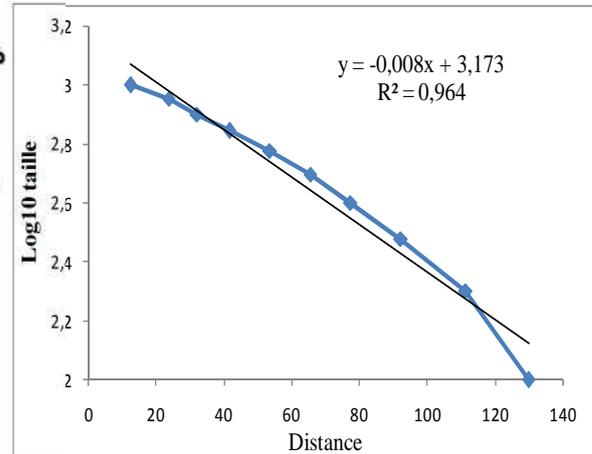


Figure 9. courbe du logarithme de la taille des fragments du marqueur en fonction de la distance migrée.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3.Ech f3, 4.Ech f3, 5.Ech f5, 6.Ech f6. M : marqueur de taille 100-bp ADN Ladder (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, et 1000 pb).

Le graphe (Figure 9), représente la courbe du logarithme de la taille des fragments du marqueur en fonction de la distance migrée, a permis d'estimer la taille de l'ADN amplifié. La taille de l'ADN amplifié est d'environ 221 pb, selon LICITRA *et al.* (2007) et PARAYRE *et al.* (2007), les amorces universelles V3P3-GC-C et V3P2 donnent des produits d'environ 233 pb. Donc l'amplification s'est bien déroulée.

1-3-2. Résultats de la PCR-TTGE

Nos résultats montrent que l'écosystème bactérien du *bouhezza* des fermes n'est pas très riche, entre trois et cinq bandes sont observées dans les différents échantillons, à l'exception de l'échantillon de 120 jours d'affinage (Ech f6), qui présente 10 bandes.

Le profil TTGE (Figure 10) a montré la présence dans *bouhezza*, des bandes associées aux espèces: **a**, *Lactobacillus plantarum*; **b**, *Lactobacillus fermentum*; **d**, *Staphylococcus equorum* subsp *linens* ; **e**, *Enterococcus faecium*; **g**, *Lactobacillus brevis* ; **i**, *Lactobacillus helveticus*/ *Lactobacillus acidophilus*/ *Lactobacillus crispatus* ; **k**, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*; **p**, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ; **v** *Bifidobacterium breve*/ *Hafnia halvei*; **x**, *Corynebacterium flavescens* ; **z**, *Lactobacillus paracasei*/ *Lactobacillus casei*/ *Lactobacillus rhamnosus*/ *Lactobacillus Zeae*/ *Bifidobacterium infantis*; **zz**, *Propionibacterium cyclohexanicum*.

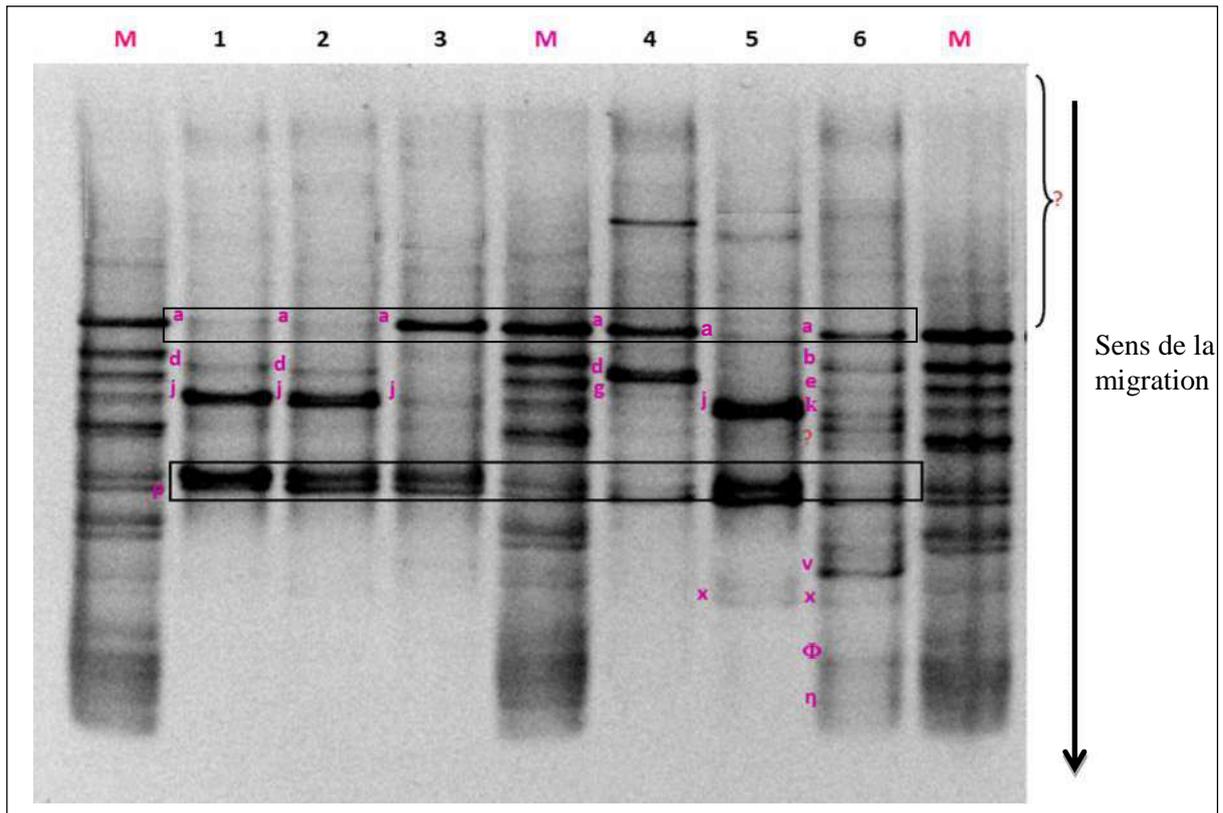


Figure 10. Résultats de la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites du *bouhezza* des fermes.

- **M :** ADN génomique marqueur (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Corynebacterium moorparkense*, *Lactobacillus paracasei*, *Arthrobacterium nicotianae*, et *Brevibacterium casei*).

- **1.** Ech f1, **2.** Ech f2, **3.** Ech f3, **4.** Ech f4, **5.** Ech f5, **6.** Ech f6.

Selon le profil TTGE, les échantillons de *bouhezza* sont caractérisés par la présence de *Lactobacillus plantarum* et de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, dans les six échantillons de différentes fermes, la bande qui correspond à *Lb. helveticus*/*Lb. acidophilus* et/ou *Lb. crispatus*, est présente dans quatre échantillons (Ech f1, Ech f2, Ech f3 et Ech f5), et la bande qui correspond à *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* est présente dans trois échantillons (Ech f1, Ech f2, et Ech f4), une bande inconnue à faible pourcentage G+C dans l'échantillon Ech f4 a également été détectée. L'échantillon le plus âgé, caractérisé par les charges bactériennes les plus faibles en différentes flores dénombrées (tableau 12), présentait la diversité bactériologique la plus riche parmi les six échantillons, avec détection de dix bandes qui correspondent à six ou sept genres (trois appartenants aux bactéries lactiques), et aux moins à dix espèces, ou probablement à plus de quinze espèces, en plus d'une bande inconnue.

Selon les résultats de AISSAOU ZITOUN (en cours), le profil de TTGE a confirmé que *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, sont les deux espèces

dominantes dans deux fabrications de *bouhezza* au lait cru de vache, durant les dix semaines de fabrication, ce qui confirme nos résultats, et les résultats de MEDJOU DJ (en cours) (Figure 11), montrent que le profil de TTGE de *bouhezza* fabriqué par lait de chèvre pendant 50 jours d'affinage (Fabrication 1 ; Figure 11) est caractérisé par la dominance des deux bandes associées à *Staphylococcus xylosum* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, mais à partir du 28^{ème} jour, cinq bandes sont dominantes associées aux espèces : *Lb. plantarum* ; *Lb. fermentum* ; *Lb. helveticus/Lb. acidophilus/Lb. crispatus*, *S. xylosum* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. On peut également noter la détection des trois bandes inconnues à faibles pourcentage G+C dans les six échantillons de Fabrication 1.

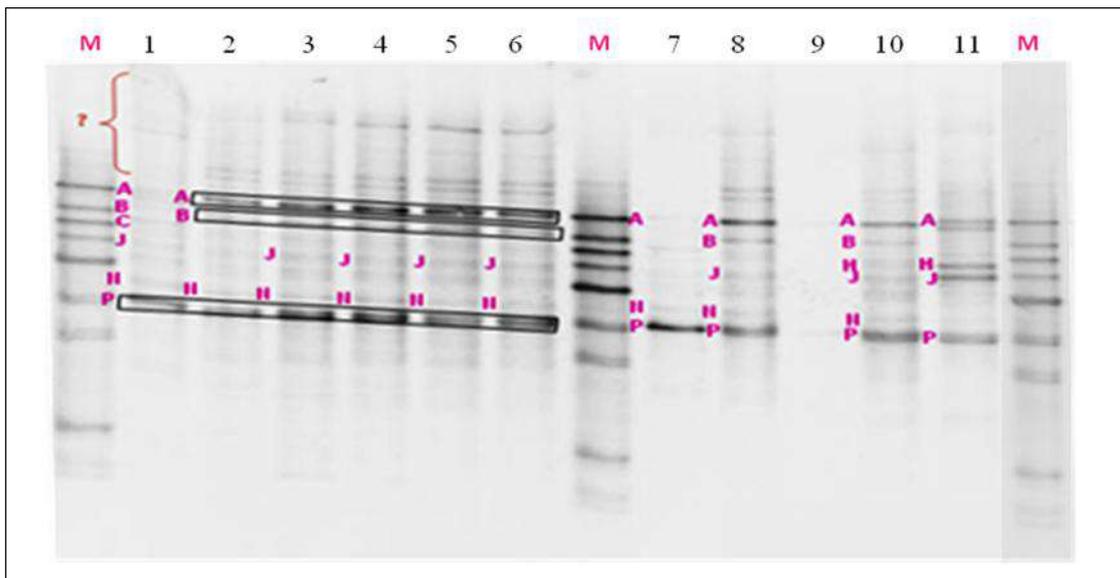


Figure 11. Résultats de la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites du *bouhezza* au lait de chèvre (d'après MEDJOU DJ (en cours)).

M : ADN génomique marqueur

Fabrication 1 : 1. *bouhezza* après 1 jour, 2. Après 14 jours, 3. Après 28 jours, 4. Après 42 jours, 5. Après 50 jours et sans piment rouge 6. Après 50 jours avec l'addition de piment rouge. **Fabrication 2 :** 7. Après 1 jour 8. Après 14 jours et 9. après 50 jours et sans piment rouge. **Fabrication 3 :** 10. Après 60 jours et sans piment rouge. Et 11. Après 72 jours avec l'addition du piment rouge.

D'après les résultats de AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b), les profils de TTGE montrent que les biofilms des deux échantillons des '*chekoua*' fabriquées à Ain Fakroun par deux peaux de chèvre sont très riches, avec la détection des 13 bandes dans la première (a. *Lb. plantarum*;b. *Lb. fermentum*;d. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*;g. *Lb. brevis* ;m. *E. faecalis*/*S. succinus*;t. *S. thermophilus*;w. *C. variabile*;z. *Bifidobacterium longum*;__. *Lb. paracasei*/*Lb. casei*/*Lb. rhamnosus*/*Lb. zaeae*/*B. infantis*;_-. *Arthrobacterium nicotianae*/*A. globiformis*/*B. tyrofermentas*;_-. *Propionibacterium microaerophilum*; en plus des deux bandes inconnues), et 10 bandes dans la deuxième (b. *Lb. fermentum*;d. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*;j. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;m. *E. faecalis*/*S. succinus*;t. *S.*

thermophilus; y. *B. breve/Hafnia alvei*; x. *C. flavescens/ B. pumillus*; ; z. *Bifidobacterium longum*; __. *Lb. paracasei/Lb. casei/Lb. rhamnosus/Lb. zae/B. infantis*; en plus d'une bande inconnue), avec la présence des six bandes communes entre les biofilms des deux échantillons des 'chekoua' (*b. d. m. t. z.* et). Après contact avec *Lben* et les deux 'chekoua' (chaque 'chekoua' à part) pendant 10 min et 24 heures, le profil TTGE a montré la présence des *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* et de *Lb. brevis* dans *Lben* qui étaient absentes avant contact, et aussi le profil de TTGE a montré l'absence de la bande associée à *Lb. helveticus/Lb. acidophilus/Lb. crispatus*, dans *Lben* après contact pendant 10 min et 24 heures, ces dernières sont pourtant présentes au départ dans *Lben* et dans le biofilm de la deuxième *chekoua*, ce qui montre probablement un effet d'interaction entre les microorganismes de *Lben* et de 'chekoua' et leurs résultats sur l'écosystème de *bouhezza*.

Plusieurs espèces des lactobacilles mésophiles ont été isolées des fromages pendant l'affinage ; les plus fréquentes sont *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. curvatus* (BERESFORD *et al.*, 2001). De nombreuses études ont montré la biodiversité du genre *Lactobacillus* dans les fromages (UGARTE *et al.*, 2006 ; TERZIC-VIDOJEVIC *et al.*, 2007). A titre d'exemple, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei* et *Lb. brevis* ont été isolées du fromage *Armada*, un fromage Espagnol à base de lait cru (HERREROS *et al.*, 2003), *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus* et *Lb. pentosus*, ont été isolées du fromage *Batzos*, un fromage traditionnel grec à base de lait cru (PSONI *et al.*, 2003).

Les analyses de TTGE de huit fromages (Camembert fabriqué à partir de lait cru, Camembert fabriqué à partir de lait pasteurisé, Brie, Emmental, Comté, Beaufort, un fromage industriel, et un fromage artisanal frais) ont montré différents profils comptant entre deux et huit bandes par produit, les fromages préparés par des procédés de fabrication similaires (par exemple; les fromages Brie, Camembert, Emmental, Comté et Beaufort) sont caractérisés par des bandes communes (qui correspond à *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, et *Streptococcus thermophilus*), le Camembert fabriqué à partir de lait cru présente le profil le plus complexe, avec huit bandes, cependant le Camembert fabriqué à partir de lait pasteurisé présente cinq bandes (OGIER *et al.*, 2002).

Selon OGIER *et al.* (2004), le profil de TTGE a permis de détecter neuf bandes dans le fromage *Morbier*, deux bandes sont directement attribuées aux espèces *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*, mais les autres bandes qui correspondent à plusieurs espèces pouvant migrer simultanément, sont confirmés après l'utilisation des amorces spécifiques à chaque espèce. SERHAN *et al.* (2009), ont rapporté que le profil TTGE a montré que l'écosystème bactérien du *Darfiyeh* au cours de l'affinage est constitué des espèces suivantes :

Lb. plantarum, *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. curvatus*, *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. malodoratus*,.

Lb. plantarum est considéré comme étant le principal lactobacille qui caractérise l'environnement laitier. Il prédomine dans plusieurs fromages comme l'*Ibore* (MAS *et al.*, 2002) et le *Nostrano di Primiero* (POZNANSKI *et al.*, 2004). Les espèces du genre *Lactobacillus* participent efficacement à la maturation des fromages (TERZIC-VIDOJEVIC *et al.*, 2007).

Les bactéries lactiques jouent un grand rôle dans la protéolyse des caséines et des peptides dans les fromages jusqu'au stade des acides aminés (KAWAI *et al.*, 1999 ; VASILJEVIC *et al.*, 2005). En comparaison avec d'autres lactobacilles mésophiles, *Lb. plantarum* présente une faible activité protéolytique, plus forte sur la caséine- que sur caséine-_{s1}, signalée pour certaines souches. Des protéinases et des peptidases ont été détectées dans les lysats cellulaires de *Lb. plantarum* isolées des fromages, et des études menées sur des extraits cellulaires de *Lb. plantarum* ont démontré une activité spécifique plus élevée vers la libération des peptides hydrophobes par rapport aux peptides hydrophiles (CORSETTI et VALMORRI, 2011).

Lc. lactis subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sont les deux sous espèces du genre *Lactococcus* les plus fréquemment isolées dans les fromages traditionnels et sont quantitativement importantes. COGAN *et al.* (1997), ont estimé que les souches identifiées à ces sous espèces peuvent représenter 38% des isolats des bactéries lactiques identifiés dans des fromages européens. Il est intéressant de noter que *Lc. lactis* subsp. *lactis* est l'espèce dominante. Cette sous espèce est présente dans les fromages au lait cru et elle est associée aux pratiques dans les fermes laitières. En revanche, les isolats de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sont moins fréquents ; ils sont incapables de survivre dans la nature et sont exclusivement associés à l'environnement laitier (CORROLER *et al.*, 1999). Elles sont largement utilisées comme ferment en fabrication fromagère (BERESFORD *et al.*, 2001). *Lc. lactis* subsp. *cremoris* peuvent se maintenir tout au long de la période d'affinage dans beaucoup des fromages au lait cru tels que le *Camembert* le *Serra* et le *Pecorino Sardo* (CORROLER *et al.*, 1998).

Les bactéries du genre *Lactococcus* possèdent une protéase associée à l'enveloppe cellulaire 'PrtP' (TAN *et al.*, 1993), elle est capable d'hydrolyser les caséine- et caséine- du lait, dans les fromages son activité sur les peptides produits par la chymosine et la pepsine a été constatée par EXTEKATE *et al.* (1997), et aussi l'activité de cette protéase sur les polypeptides_{s1}(1-23) et -(1-28) a été démontré (ARDO, 2001 ; JENSEN *et al.*, 2009).

Les bactéries non lactiques des fromages appartiennent essentiellement aux groupes des staphylocoques et des bactéries corynéformes (IRLINGER, 2000). La plupart des espèces de

ce groupe ont un intérêt dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages (MOREA *et al.*, 1999 ; BLAIOTTA *et al.*, 2004). *Staphylococcus equorum* est l'espèce la plus fréquente dans les fromages (COGAN, 2011), Une nouvelle sous espèce, *S. equorum* subsp. *linens*, isolée à partir des surfaces des fromages Suisses au lait cru (pâte pressée), vient d'être décrite par PLACE *et al.* (2003). Actuellement, seules quelques souches de ces bactéries sont utilisées comme levain (MONTEL *et al.*, 2005).

En conséquence, le fromage *bouhezza* est caractérisé par des charges importantes en flore lactique (flore principale), et la technique moléculaire PCR-TTGE montre que l'écosystème bactérien du *bouhezza* des fermes n'est pas aussi riche et a permis la détection de trois à cinq bandes dans cinq échantillons, et la présence de *Lactobacillus plantarum* et de *Lactococcus. Lacis* subsp. *cremoirs*, comme des espèces dominantes dans les six échantillons. L'exception a été le sixième échantillon, avec détection de dix bandes qui correspondent à six ou sept genres et probablement à quinze espèces, en plus d'une bande inconnue.

2- Caractérisations physicochimiques

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques classiques (pH, extrait sec total, teneur en matière grasse, teneur en acide lactique et taux de NaCl), sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13. Valeurs des paramètres physico-chimiques pour les six échantillons de *bouhezza*. Lactate : acidité exprimée en acide lactique (g pour cent g de produit frais). EST : extrait sec total (g

Echantillons	pH	EST	MG	NaCl	Lactate
Ech f1	4,12 ±0,02	24,1±0,03	8,0	2,36	0,78
Ech f2	4,11 ±0,04	23,4±0,25	8,5	2,31	0,79
Ech f3	4,04 ±0,00	24,3±0,25	6,0	2,3	0,87
Ech f4	4,05 ±0,01	27,5±0,18	10,0	2,14	1,18
Ech f5	3,96 ±0,02	28,3±0,11	7,5	1,04	1,39
Ech f6	3,99 ±0,01	32,2±0,26	12,8	1,71	1,69

pour cent g de produit frais). MG : matière grasse (g pour cent g de produit frais). NaCl (g pour cent g de produit frais).

- Valeurs moyennes ± l'écart type (trois mesures pour le pH, et de quatre essais pour l'EST).
- Valeurs moyennes des deux essais (pour MG, NaCl et Lactate)

2-1. pH et acidité

L'observation des valeurs expérimentales montre que le pH des six échantillons est compris entre 3,96 et 4,12 (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a). Ces valeurs sont proches des valeurs signalées sur des différents échantillons de *bouhezza* des fermes, soit pH = 4,03 (AISSAOUI ZITOUN, 2004), pH = 3,9 (NIMER, 2006), et pH = 4 (LEMOUCHI, 2007). Et aussi sur différents échantillons de *bouhezza* des fabrications, avec pH de 4 à 4,1 entre le

28^{ème} jour et 70^{ème} jour de fabrication (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). Le mode de fabrication de *bouhezza* est marqué par l'utilisation du *Lben* caractérisé par son pH acide de 4,5 (AISSAOUI ZITOUN, 2004), 4,2 (BENMASSAI et FATHALLAH, 2009).

Le pH de *bouhezza* est d'environ 4, ceci suggère que l'activité de sa flore microbienne lactique est assez importante et que, soit le milieu ne permet pas le développement de la flore de dégradation d'acide lactique en nombre important, soit les ajouts en continue de *Lben*/lait cru (source de lactose et des ferments lactiques), ne permettent pas à ces flores d'augmenter le pH.

La teneur en acide lactique dans les six échantillons est entre 0,78 et 1,69 g d'acide lactique pour cent g de *bouhezza*, soit entre 3,24 et 5,25 g d'acide lactique pour cent g de matière sèche, ces résultats sont proches de ceux rapportés par AISSAOUI ZITOUN (2004), avec des valeurs évoluant durant les premiers 55 jours de fabrication (avant les ajouts de lait cru) de 1,06 à 4,69 g d'acide lactique pour cent g de matière sèche. A la fin de la fabrication (70 jours d'âge), le taux d'acide lactique est de l'ordre de 5,8 g pour cent g de la matière sèche soit 2 % dans le fromage (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). BENMASSAI et FATHALLAH (2009), ont signalé des valeurs durant la période de fabrication entre 0,78% et 1,85% (g/100g de *bouhezza*). Un échantillon de ferme à Ain Fakroun après 45 jours de fabrication, a une teneur en acide lactique de 0,87% (AISSAOUI ZITOUN, 2004), nos résultats sont légèrement inférieurs à ces valeurs.

La différence des teneurs en acide lactique dans les six échantillons serait due à la différence des conditions de fabrication, des caractéristiques de la matière première, des charges bactériennes et de l'âge de maturation. Donc le pH faible et l'acidité sont des caractéristiques de *bouhezza*.

2-2. Matière grasse

Nous notons que la teneur en matière grasse dans les six échantillons est variable, avec des valeurs entre 6 et 12,8 g pour cent g de fromage, qui représente entre 24,7 et 39,75 g par cent g de matière sèche, selon les résultats de AISSAOUI ZITOUN (2004), la teneur en matière grasse varie durant la fabrication entre 1,2% dans la matière première à 10,8% dans la pâte fromagère après 70 jours de fabrication (soit de 12 à 35,85 g par cent g de matière sèche), et principalement après l'adjonction de lait cru de vache, la teneur en matière grasse augmente de 6,7% à 10,8% (de 50 jours à 70 jours).

La variation des teneurs en matière grasse entre les six échantillons des fermes serait due aux caractéristiques des matières premières, et essentiellement les ajouts du lait cru ou non, pour les trois échantillons, Ech f1, Ech f2 et Ech f3, qui sont fabriqués seulement par *Lben*, présentent les teneurs les plus faibles.

Pour la classification des échantillons de *bouhezza* des fermes, selon codex alimentaire, ces échantillons appartiennent à la catégorie des fromages mi gras, leur teneur en matière grasse est entre 24,7 et 39,75 g par cent g de matière sèche, c'est la même classification donnée par AISSAOUI ZITOUN (2004).

Selon les teneurs en matière grasse données par GUINEE et MCSWEENEY (2006), sur différents types de fromage (*Danish Havarti* 46,9g par cent g de matière sèche, *Tilsiter* 46%, *Coulommiers* 46,8%, *Cheddar*, *Gouda*, *Blue* et *Brie* entre 42% et 56%, *Feta* 48% respectivement, et le *Kefalograviera* 49%), la teneur en matière grasse de *bouhezza* est la plus faible.

2-3. Extrait sec total

Des valeurs de matière sèche entre 23,4% et 32,2% sont enregistrées pour les six échantillons, ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011a), qui ont montré que l'extrait sec total durant les dix semaines de fabrication a évolué de 9,02 % à 35,86 %, avec des fluctuations plus ou moins importantes. Il passe de 9,42% dans la matière première de départ à 20,6% au cours de la première semaine, après trois semaines il atteint 23,3%, et il se stabilise à environ 30% durant les cinq semaines qui suivent, puis il passe à 35,8% à la fin de fabrication (après dix semaines). Cette augmentation est due à l'exsudation du lactosérum à travers les perforations naturelles de la *chekoua* tout au long de la fabrication. En effet, l'ajout régulier de *Lben* et de lait cru et l'égouttage en continu permettent une augmentation du poids de la masse fromagère.

Et aussi, nos résultats sont largement inférieurs par rapport à un échantillon de ferme à Ain Fakroun après 45 jours de fabrication, qui est préparé au départ par *Lben* de vache mais les ajouts sont réalisés par lait de chèvre, avec un extrait sec total d'environ 35,3% (AISSAOUI ZITOUN, 2004), les échantillons Ech f1 et Ech f2 (âge de 45 jours) présentent des teneurs d'environ 24%, selon AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006), à 50 jours de fabrication ont enregistré des valeurs d'environ 29%.

Cette différence importante serait due à la variabilité en extrait sec des matières premières qui sont utilisées pour la fabrication, et aux conditions de préparation, et essentiellement les vitesses de l'égouttage et les quantités du lait ou *Lben* ajoutées avant la fin de la fabrication.

La teneur en eau exprimée en pourcentage dans le fromage dégraissé 'TEFD', pour les six échantillons de *bouhezza* est entre 77,5% et 83,7%. Selon la classification de codex alimentaire, *bouhezza* des fermes appartient à la catégorie des fromages à pâtes molles, c'est la même classification donnée par AISSAOUI ZITOUN (2004).

2-4. Taux de NaCl

Comme le montre le tableau 13, le taux de NaCl varie considérablement entre les six échantillons analysés, avec des valeurs entre 1,04% et 2,36%, (soit entre 10,4 et 23,6 g NaCl. Kg⁻¹), nous observons que les échantillons les moins âgés et n'ayant pas subi des ajouts de lait cru présentent des valeurs plus élevées que les autres, selon les résultats de AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011a), la teneur en chlorures de *bouhezza* est assez importante entre la première et la septième semaine de fabrication avec un taux qui varie entre 2,4 et 4 g pour cent g de fromage, suite à l'adjonction de lait cru non salé, la teneur en chlorure baisse durant la dixième semaine à 2,3 g pour cent g de fromage. Selon ALAIS et LINDEN (1997) et FOX *et al.* (2000), la plupart des fromages ont un taux en sel de 10 et 20 g.Kg⁻¹. Les échantillons Ech f1, Ech f2, Ech f3 et Ech f4 présentent des valeurs proches aux valeurs enregistrées pour un échantillon de ferme à 45 jours de fabrication, qui possède une teneur de 2,32 g pour cent g de fromage. Pour ce fromage le salage est réalisé seulement pendant le remplissage de *chekoua* par *Lben* avec des quantités supérieures à 500 g, mais les autres ajouts de lait de chèvre sont rarement accompagnés de salage (AISSAOUI ZITOUN, 2004).

Les différences entre les valeurs des taux de NaCl seraient dues à la différence de mode de salage, les quantités de sel et les fréquences des ajouts de *Lben*/lait et aussi à la nature des matières premières utilisées.

2-5. Taux de l'azote total et ses fractions

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

Tableau 14. Valeurs moyennes des fractions azotées pour les six échantillons.

Echantillons	NT	MAT	ANC (%NT)	ANP (%NT)
Ech f1	2,07	13,20	8,49	5,66
Ech f2	1,95	12,44	8,65	5,76
Ech f3	2,39	15,25	9,52	7,61
Ech f4	2,33	14,86	10,83	9,16
Ech f5	2,81	17,93	12,61	9
Ech f6	2,67	17,03	16,23	13,67

NT : Azote total (g pour cent g de produit frais). **ANC (%NT)** : pourcentage de l'azote soluble à pH 4,6 par rapport au NT. **ANP (%NT)** pourcentage de l'azote non protéique par rapport au NT. **MAT** : matière azotée totale (NT x 6,38).

Les valeurs en azote total dans les six échantillons varient de 1,95 et 2,81 g par cent g de fromage (tableau 14), ce qui représente des valeurs en matières azotées totale entre 12,44 et 17,93 g par cent g de fromage.

Selon les résultats de AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006), AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011a), la teneur en azote totale est variable durant la fabrication entre 0,54% dans la matière première (*Lben*) à 3,03% dans la pâte fromagère après 70 jours de fabrication, ce qui représente des valeurs de matière azotée totale de 3,45% de *Lben* à 19,32% dans *bouhezza* après dix semaines de fabrication.

D'après AISSAOUI ZITOUN (2004), à 40 jours de fabrication les valeurs en azote total sont de 2,38%, ces résultats sont aussi similaires aux résultats observés pour un échantillon de ferme à Ain Fakroun après 45 jours d'affinage qui présente une valeur de 2,2%. Nos résultats sont un peu plus faibles par rapport à ces valeurs, pour les échantillons Ech f1 et Ech f2 (2,07 % et 1,95% en azote total, respectivement). Aussi, d'après AISSAOUI ZITOUN (2004), à 63 jours de fabrication la teneur est de 2,56% et les échantillons Ech f3 et Ech f4 après 60 jours de maturation présentent 2,39% et 2,33%, respectivement. Et à la fin de fabrication (après 70 jours), *bouhezza* présente une valeur de 3,03% en azote total, et notre échantillon Ech f5 (75 jours) présente une valeur de 2,81 %.

La fraction de l'azote soluble à pH 4,6 dans l'azote total est souvent utilisée comme indicateur de la maturation des fromages (REVILLE et FOX, 1978 ; BYNUM et BARBANO, 1985 ; LABORDA et RUBIOLO, 1999 ; GOROSTIZA *et al.*, 2004). Pour les six échantillons le taux de maturation varie de 8,49% à 16,23%, nous remarquons que le taux de maturation augmente avec l'âge d'affinage de *bouhezza*. D'après la littérature, le taux de maturation varie selon les fromages, comme le *Gouda* présente des valeurs d'environ 13% après six semaines (MESSENS *et al.*, 1999), et après 24 semaines il atteint 23% à 25% (EXTERKATE et ALTING, 1995), le *Darfiyeh* est caractérisé par un taux de protéolyse qui varie de 17% à 20% après deux mois d'affinage (SERHAN *et al.*, 2010), le *Camembert* à un mois d'affinage, son taux de maturation est d'environ 15% à 17% en surface (MICHALSKI *et al.*, 2003), et d'environ 9% à 12% seulement dans le cœur (SOUSA et MCSWEENEY, 2001), le *Feta* présente un taux de protéolyse d'environ 17% à 20% après deux à six mois de maturation (SARANTINOPOULOS *et al.*, 2002 ; MICHAELIDOU *et al.*, 2003). Le *Cheddar* présente des valeurs d'environ 20% à 25% après 4 mois d'affinage (REHMAN et FOX, 2002 ; BARRETT *et al.*, 1999), dans le *Parmesan* le taux de protéolyse atteint 35% après deux ans d'affinage (CARERI *et al.*, 1996), et le *Gorgonzola* peut présenter des taux qui peuvent aller jusqu'à 43% à 46% (ZARMPOUTIS *et al.*, 1997).

Le taux de l'azote non protéique dans les six échantillons est entre 5,66% et 13,67%, ces valeurs sont un peu faibles par rapport à celles rapportées pour le *Darfeyh*, qui présente des valeurs entre 14% et 18% après deux mois d'affinage (SERHAN *et al.*, 2010), Cependant ces valeurs sont un peu similaires pour le *Telem*, qui présente des valeurs entre 7% et 10% après trois mois d'affinage (PAPPA *et al.*, 2006).

La protéolyse de *bouhezza* ne peut se faire que par les enzymes natives du lait (essentiellement la Cathepsine D et la plasmine), et aussi par les protéases endogènes apportées par les microorganismes. Le pH optimum d'activité de la cathepsine D est 4 (FOX *et al.*, 2000 ; Mcsweeney, 2011), c'est le pH enregistré pour *bouhezza*. Selon FOX et MCSWEENEY (1996), les différences de teneur en azote soluble sont dues à des différences de l'humidité, du température, de pH, et la durée de maturation,

Le taux d'humidité est considéré comme un facteur important affectant le degré de la protéolyse, des taux élevés de NaCl et de l'humidité pourraient justifier l'activité protéolytique basse observée dans des fromages artisanaux (CALVO *et al.*, 2007). Dans le procédé de fabrication de *bouhezza*, il n'y a pas d'adjonction des protéases, ni utilisation des ferments sélectionnés, et aussi l'effet de l'égouttage en continue ce qui expliquerait les résultats enregistrés.

Ces résultats montrent que le fromage *bouhezza* de ferme est caractérisé par une protéolyse peu importante, probablement due à l'activité des enzymes du lait cru, et de la flore microbienne, essentiellement la flore lactique qui est présente avec des nombres importants.

3- Caractérisations de la protéolyse

3-1. Electrophorèse de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 sur gel de polyacrilamide en présence d'urée (PAGE-Urée)

La protéolyse primaire dans les fromages correspond aux changements des caséines- α_1 , α_2 et β , qui peuvent être détectées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, particulièrement par PAGE-Urée (PAVIA *et al.*, 2000). La sensibilité et le pouvoir de résolution de cette technique lui ont valu d'être considérée comme un outil performant dans l'évaluation de la protéolyse des caséines.

L'identification des bandes se fait à l'aide de marqueur des caséines natives et par comparaison aux littératures. Par exemple : DE WIT *et al.*, (2005), ont identifié 22 bandes à partir de la littérature durant l'affinage du *Cheddar* après l'adjonction des levures.

Le profil électrophorétique des protéines insolubles à pH 4,6 a montré différentes bandes (Figure 12), qui correspondent aux caséines natives, et les fragments résultants de leur hydrolyse. Dans le profil électrophorétique, il existe deux bandes caractéristiques très intenses, qui correspondent aux caséines natives (caséine- α_1 et caséine- α_2)

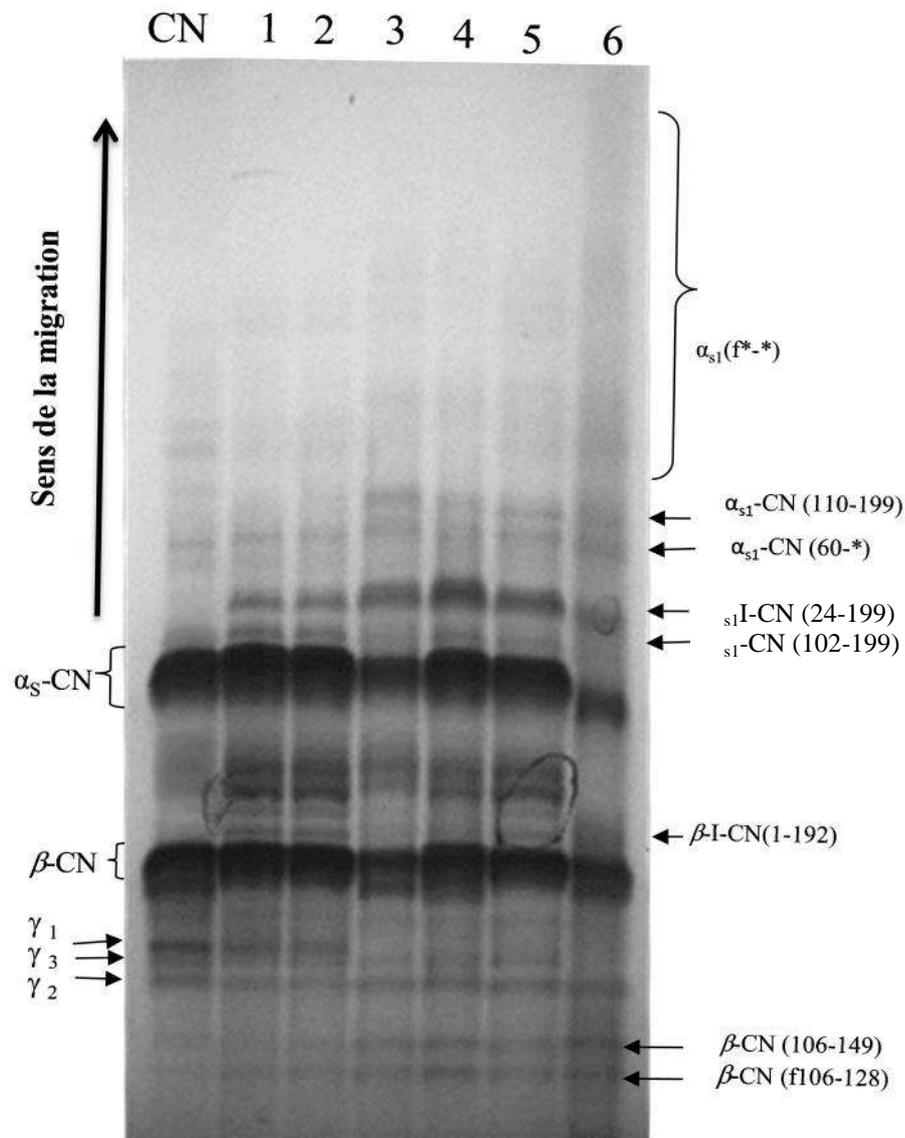


Figure 12. PAGE-Urée des protéines insolubles à pH 4,6 de *bouhezza* de différentes fermes.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3. Ech f3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6. CN. Caséine bovine entière.

La bande qui possède la mobilité la plus élevée était les caséines-_s. la caséine-_s se déplace avec mobilité plus faible (MCSWEENEY *et al.*, 1994 ; SOUSA et MALCATA, 1998). Nous observons trois bandes de mobilité plus faible que celle de caséine-_s, ces bandes correspondant aux γ_2 - (-CN f106-209) γ_1 - (-CN f29-209), et γ_3 - (-CN f108-209) (SOUSA *et al.*, 2001 ; FALLICO *et al.*, 2004 ; DE WIT *et al.*, 2005). Ces peptides se produisent par l'action précoce de la plasmine sur la caséine-_s (KELLY *et al.*, 2006).

L'intensité de ces trois bandes diminue dans les échantillons de *bouhezza* les plus âgés, on observe que l'intensité de la bande de γ_1 - (-CN f29-209) est très faible dans les échantillons de 60, 75 et 120 jours de maturation, probablement l'hydrolyse de ces fragments se produit par des enzymes microbiennes.

Deux bandes de mobilité plus lente que les trois bandes des caséines- ont été détectées, selon DE WIT *et al.* (2005), ces bandes correspondent aux -CN (f106-149) et -CN (f106-128), ces fragments produits à partir de caséine- , et peut être par l'action de plasmine du lait ou des enzymes microbiennes à activité similaire de celle de trypsine (FALLICO *et al.*, 2004 ; 2005), l'intensité de ces bandes est plus forte dans les échantillons de *bouhezza* les plus âgés (Ech f4 f5et f6), ce qui correspond à la diminution de l'intensité des bandes de caséine- .

L'hydrolyse de caséine-₁ par la chymosine produit des peptides qui se déplacent plus vite que les caséines-_s natives (MCSWEENEY *et al.*, 1994 ; FALLICO *et al.*, 2004), qui se trouvent juste après les bandes de caséine-_s, et qui correspondent aux fragments _{s1}I-CN(f 24-199) et _{s1}-CN(f 102-199), mais la détection de ces peptides dans *bouhezza* serait due à l'action de Cathepsine D ou par des enzymes microbiennes, la spécificité de Cathepsine D sur la caséine-_{s1} est similaire à l'action de Chymosine (MCSWEENEY *et al.*, 1994 ; MOONEY *et al.*, 1998).

Deux bandes de mobilité plus élevée que _{s1}I-CN(f 24-199) et _{s1}-CN(f 102-199), ont été détectées, selon DE WIT *et al.* (2005) ces bandes correspondent probablement au _{s1}-CN (110-199) et _{s1}-CN (60-*) (* : extrémité C-terminale non identifiée).

D'après FALLICO *et al.* (2005), des fragments avec la mobilité la plus élevée peuvent être produits à partir de caséine-_{s1}, ce qui correspond au _{s1}-(f^{*.*}). Nous observons que l'échantillon de 120 jours d'affinage présente une protéolyse plus prononcée par rapport aux autres échantillons.

Donc la protéolyse primaire des caséines de *bouhezza* des fermes par les protéinases du lait et/ou de sa microflore, permet de donner différents fragments casiéniques insolubles à pH 4,6 détectés par PAGE-Urée, qui correspondent aux fragments : -CN (f106-128), -CN (f106-149), les caséines- γ (₂, ₃ et ₁), I-CN (1-192), α_{S1} -CN (102-199), α_{S1} I-CN (24-199). _{s1}-CN (110-199) et _{s1} CN (60-*), en plus des autres fragments _{s1} (f^{*.*}).

3-2. Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC)

L'HPLC en phase inverse a été largement utilisée pour caractériser les peptides des hydrolysats des caséines (MCSWEENEY *et al.*, 1994), cette technique est également très précieuse pour séparer les peptides dans les extraits azotés des fromages (DE LLANO *et al.*, 1995 ; LABORDA et RUBIOLLO, 1999 ; PAVIA *et al.*, 2000), principalement les fractions solubles en eau, ou à pH 4,6 et les fractions solubles et insolubles dans l'éthanol à 70%, ces fractions azotées sont extensivement analysées dans plusieurs fromages, par exemple : *Cheddar* (FOLKERTSMA *et al.*, 1995 ; WALLACE et FOX, 1996 ; REHMAN *et al.*, 2000), *Emmental* (ROHM *et al.*, 1996), *Canestrato Pugliese* (ALBENZIO *et al.*, 2001), *Pr st*

(PRIPP *et al.*, 2006), *Taleggio* (GOBBETTI *et al.*, 1997,) *Canestrato Pugliese*, *Fiore Sardo* et *Pecorino Romano* (DI CAGNOA *et al.*, 2003), *Fossa* (GOBBETTI *et al.*, 1999), *Teleme* (PAPPA *et al.*, 2006), *Ragusano* (FALLICO *et al.*, 2004 ; 2005).

Pour le fromage *bouhezza* c'est la première fois qu'on effectue l'analyse par l'HPLC de quelques fractions azotées.

Selon plusieurs auteurs (DE LLANO *et al.*, 1995 ; LABORDA et RUBIOLO, 1999 ; HAYALOGLU *et al.*, 2004 ; FALLICO *et al.*, 2005), les chromatogrammes de RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6, solubles et insolubles dans l'éthanol à 70% peuvent être divisés en 3 zones, la plupart des acides aminés libres sont élués de 0 min à 10 min, les peptides hydrophiles dans l'intervalle de 10 min à 35 min, et la fraction des peptides hydrophobes est généralement élue dans l'intervalle de 35 à 65 min ou jusqu'à 70 min.

Les chromatogrammes de RP-HPLC de différentes fractions azotées des fromages sont généralement complexes et présentent un nombre très élevé des pics avec des profils caractéristiques (FOX et MCSWEENEY, 1997). Les profils de RP-HPLC de la fraction soluble à pH 4,6 et des sous-fractions de celui-ci présentent des caractéristiques qui dépendent de la variété des fromages (FOX *et al.*, 2000). D'après la littérature, les chromatogrammes des fractions azotées des fromages des fabrications similaires, ou le suivi du cinétique de la même fabrication présente des profils caractérisés par la présence de plusieurs pics avec les mêmes temps de rétention (Figure 13) (LYNCH *et al.*, 1996 ; GOBBETTI *et al.*, 1999 ; PRIPP *et al.*, 2000 ; HAYALOGLU *et al.*, 2004 ; QUINTO *et al.*, 2007).

Il est admis que le pourcentage des surfaces qui correspondent aux peptides hydrophiles et aux peptides hydrophobes et le rapport des surfaces des chromatogrammes des peptides hydrophobes par rapport aux peptides hydrophiles est un moyen utilisable pour évaluer le processus du protéolyse dans les fromages (DE LLANO *et al.*, 1995 ; MALLATOU *et al.*, 2004 ; PICON *et al.*, 2007; TEJADA *et al.*, 2008 ; VIVAR-QUINTANA *et al.*, 2009).

Nous avons remarqué que pour les trois fractions des six échantillons analysés, il n'y a pas des pics après la 65^{ème} min.

Les chromatogrammes des fractions azotées de *bouhezza* solubles à pH 4,6 ne présentent pas des pics caractéristiques communs pour les six échantillons (Figure 13), probablement parce que la qualité et les quantités des peptides et des acides aminés sont différentes dans les six échantillons des fermes, cette différence serait due à l'effet du processus de fabrication caractérisé par l'ajout de *Lben*/lait cru et l'égouttage en permanent pendant l'affinage de *bouhezza*.

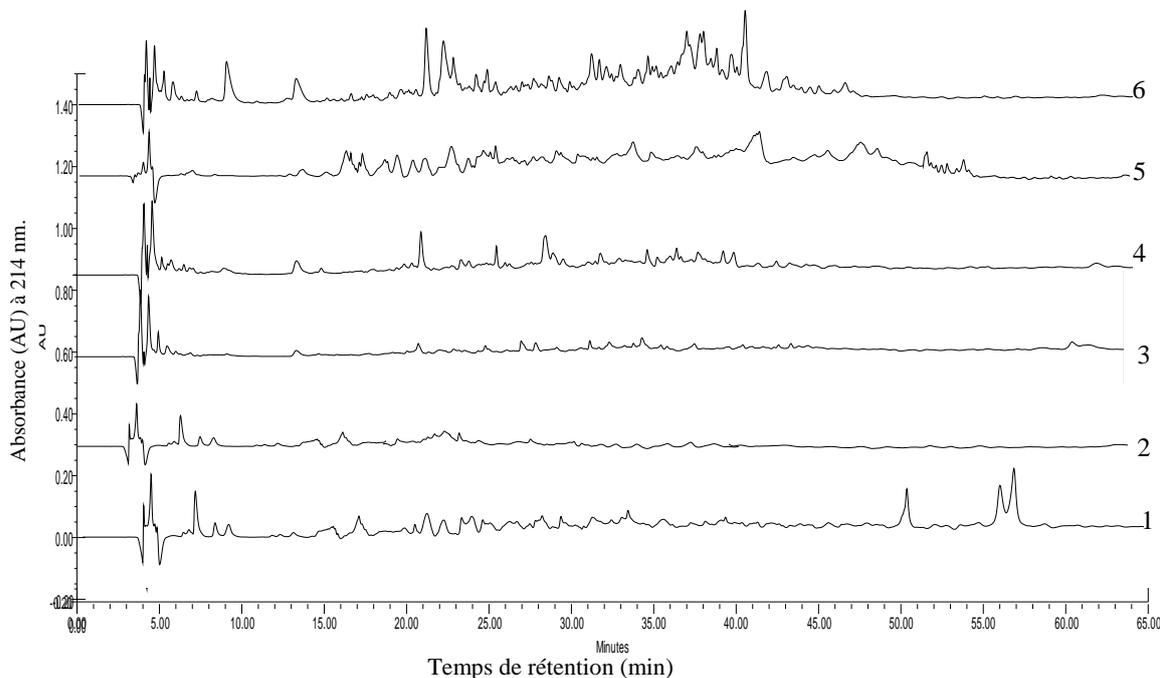
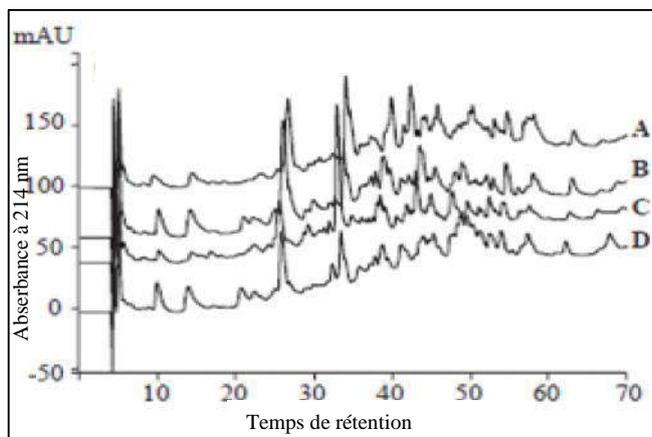
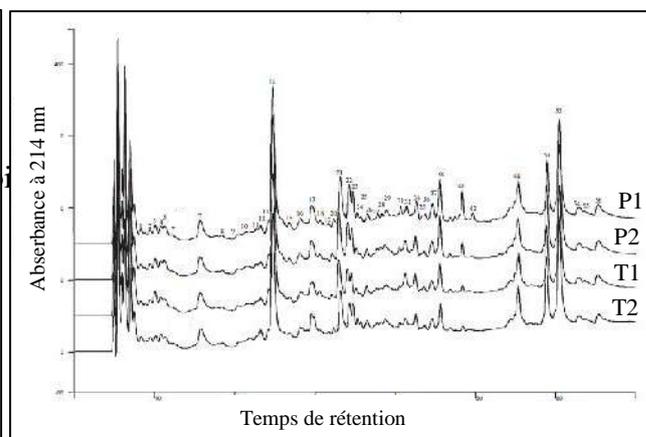


Figure 13. Superposition des chromatogrammes de RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 pour les six échantillons de *bouhezza*.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3. Echf3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6.



Profil de la RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 du fromage turc 'White-brined' fabriqué par addition de différentes souches (**A.** *Lc. lactis subsp. lactis* UC317, **B.** *Lc. lactis subsp. lactis* NCDO763, **C.** *Lc. lactis subsp. cremoris* HP et **D.** *Lc. lactis subsp. cremoris* SK11at 1) (d'après HAYALOGLU *et al.*, 2004).



Profil de la RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 du fromage 'Tulum' affiné dans des sacs en plastique ou dans une peau de chèvre (à 90 jours). P et T : se référer aux fromages affinés en matériaux de plastique (P) ou dans une peau de chèvre (T) (d'après HAYALOGLU *et al.*, 2007).

Figure 14. Exemples des profils du RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6 pour deux types des fromages.

Les résultats de RP-HPLC permettent de calculer le pourcentage des surfaces des trois zones par rapport à la surface totale des chromatogrammes, qui correspond aux acides aminés libres, les peptides hydrophiles et les peptides hydrophobes (tableau 15).

Tableau 15. Pourcentage des surfaces de différentes zones des chromatogrammes de la fraction insoluble dans 70% d'éthanol.

Echantillons	Intervalles des temps	Pourcentage de surface (%)	Rapport Pt phob/Pt phil
Ech f1	De 0 à 10min	21,35	0,90
	De 10 à 35min	41,35	
	A partir de 35min	37,30	
Ech f2	De 0 à 10min	20,50	0,85
	De 10 à 35min	42,90	
	A partir de 35min	36,60	
Ech f3	De 0 à 10min	23,70	0,90
	De 10 à 35min	40,11	
	A partir de 35min	36,19	
Ech f4	De 0 à 10min	19,30	0,77
	De 10 à 35min	45,42	
	A partir de 35min	35,28	
Ech f5	De 0 à 10min	27,69	0,78
	De 10 à 35min	40,6	
	A partir de 35min	31,71	
Ech f6	De 0 à 10min	16,14	0,54
	De 10 à 35min	54,51	
	A partir de 35min	29,39	

Rapport Pt phob/Pt phil: rapport des surfaces du chromatogramme des peptides hydrophobes par rapport à la surface qui correspond aux peptides hydrophiles.

Les pourcentages des surfaces qui correspondent aux acides aminés libres pour les six échantillons sont entre 16,14%, et 27,69%, cette surface est moins importante dans l'échantillon le plus âgé (16,14%).

Les surfaces qui correspondent aux peptides hydrophiles représentent les pourcentages les plus élevés, entre 40,11% et 54,5% dans les six échantillons. Nous observons que l'échantillon le plus âgé est caractérisé par le pourcentage le plus élevé, selon les résultats de VIVAR-QUINTANA *et al.* (2009), sur 224 échantillons des différents fromages de trois types de lait cru (vache, chèvre et de brebis), les pourcentages des surfaces des peptides hydrophiles augmentent avec l'âge de l'affinage, des résultats similaires ont été rapportés par TEJADA *et al.* (2008).

Le rapport des pourcentages des surfaces des peptides hydrophobes par rapport aux pourcentages des surfaces des peptides hydrophiles est entre 0,92 et 0,54 pour les six échantillons, cependant le sixième échantillon présente le rapport le plus faible (0,54).

DE LLANO *et al.* (1995), ont rapporté que le rapport des pourcentages des surfaces des peptides hydrophobes par rapport aux peptides hydrophiles dans les extraits azotés solubles dans l'eau, diminue avec l'âge d'affinage pour six fromages artisanaux (*Afuega'l Pitu blanc*, *Afuega'l Pitu rouge*, *Vidiago*, *Beyos*, *Cabrales* et *Ped*), cette diminution est corrélée positivement avec l'âge de maturation. Le faible rapport des pourcentages des surfaces des peptides hydrophobes par rapport aux pourcentages des surfaces des peptides hydrophiles, dans l'échantillon Ech f6, probablement est le résultat de dégradation des peptides hydrophobes en peptides plus petits et en acides aminés.

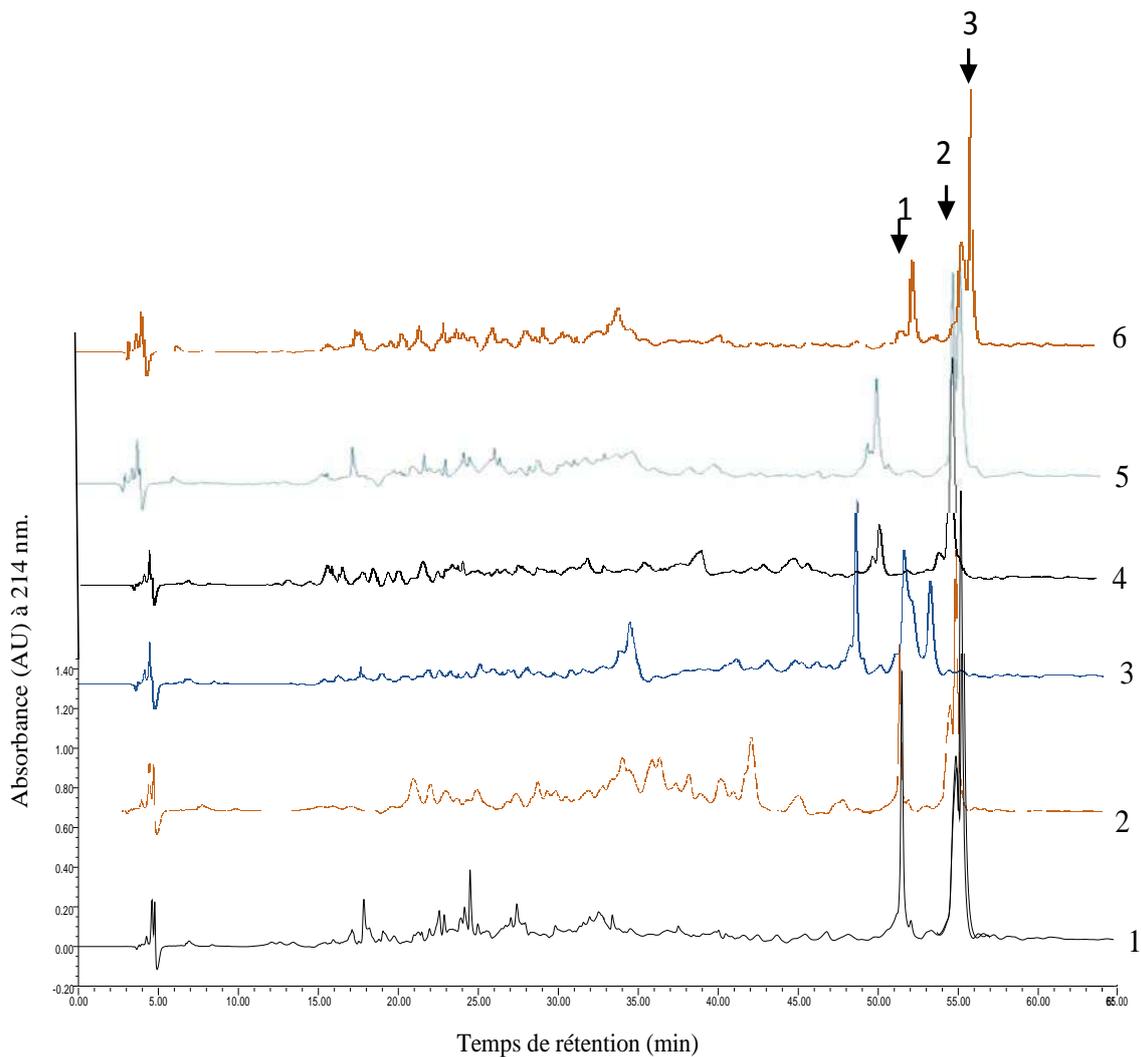


Figure 15. Superposition des chromatogrammes de RP-HPLC obtenus de la fraction insoluble dans l'éthanol à 70% pour les six échantillons.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3. Echf3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6.

Tableau 16. Pourcentage des surfaces de différentes zones des chromatogrammes de la fraction insoluble dans l'éthanol à 70%.

Echantillons	Intervalles de temps	Pourcentage de surface (%)	Rapport Pt phob/Pt phil
Ech f1	De 0 à 10min	12,05	0,90
	De 10 à 35min	46,37	
	A partir de 35min	41,58	
Ech f2	De 0 à 10min	14,48	1,14
	De 10 à 35min	39,87	
	A partir de 35min	45,65	
Ech f3	De 0 à 1min	12,69	1,67
	De 10 à 35min	32,68	
	A partir de 35min	54,63	
Ech f4	De 0 à 10min	9,55	1,50
	De 10 à 35min	36,18	
	A partir de 35min	54,27	
Ech f5	De 0 à 10min	7,64	1,40
	De 10 à 35min	38,38	
	A partir de 35min	53,98	
Ech f6	De 0 à 10min	5,62	1,90
	De 10 à 35min	32,49	
	A partir de 35min	61,89	

Rapport Pt phob/Pt phil : rapport des surfaces du chromatogramme des peptides hydrophobes par rapport à la surface qui correspond aux peptides hydrophiles

Les chromatogrammes obtenus par RP-HPLC de la fraction insoluble dans l'éthanol à 70% (Figure 15), présentent trois pics caractéristiques communs pour les six échantillons, avec des hauteurs très élevées (le pic 3 de l'échantillons Ech f1 est le plus élevé et présente 16,62% de la surface totale du chromatogramme), et des temps des retentions entre et 50 min et 55 min, les trois pics caractéristiques de l'échantillon Ech f3 ayant des temps de retentions (48min, 51min et 53min) inférieurs par rapport aux autres échantillons.

Le pourcentage des surfaces qui correspondent aux acides aminés libres est entre 5,62% et 14,48%, nous observons que le pourcentage de cette surface est plus important dans les échantillons les moins âgés que dans les plus âgés. et l'échantillon Ech f6 présente le pourcentage le plus faible (5,62%). Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés par FALLICO *et al.* (2005) dans le fromage *Ragusano* (entre 18% et 22% en acides aminés libres).

Le rapport des surfaces des peptides hydrophobes par rapport aux peptides hydrophiles se situe entre 0,9 et 1,90, on observe que l'échantillon Ech f6 présente le rapport le plus élevé (rapport de 1,9), par contre à l'échantillon Ech f1 (rapport de 0,9).

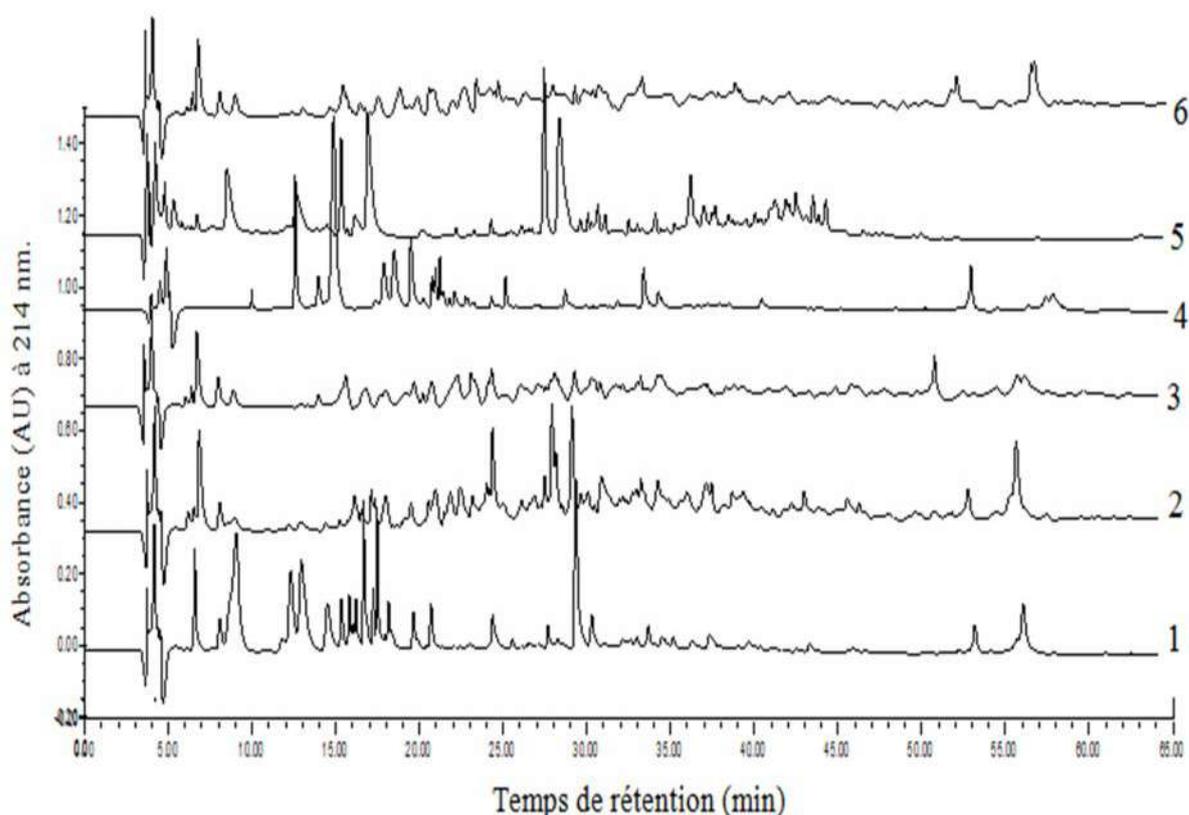


Figure 16. Superposition des chromatogrammes de RP-HPLC obtenus de la fraction soluble dans l'éthanol à 70%.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3. Echf3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6.

Tableau 17. Pourcentage des surfaces de différentes zones des chromatogrammes de la fraction soluble dans l'éthanol à 70%.

Echantillons	Intervalles de temps	Pourcentage de surface (%)	Rapport Pt phob/Pt phil
Ech f 1	De 0 à 10min	13,66	0,72
	De 10 à 35min	50,09	
	A partir de 35min	36,25	
Ech f 2	De 0 à 10min	14,30	0,80
	De 10 à 35min	47,58	
	A partir de 35min	38,12	
Ech f 3	De 0 à 1min	11,67	0,92
	De 10 à 35min	45,88	
	A partir de 35min	42,45	
Ech f 4	De 0 à 10min	14,13	0,81
	De 10 à 35min	47,22	
	A partir de 35min	38,65	
Ech f 5	De 0 à 10min	9,91	0,93
	De 10 à 35min	46,47	
	A partir de 35min	43,62	
Ech f 6	De 0 à 10min	8,49	0,72
	De 10 à 35min	52,63	
	A partir de 35min	38,88	

Rapport Pt phob/Pt phil : rapport des surfaces du chromatogramme des peptides hydrophobes par rapport à la surface qui correspond aux peptides hydrophiles

Les chromatogrammes obtenus par RP-HPLC de la fraction soluble dans l'éthanol à 70% ne présentent pas des pics caractéristiques communs entre les six échantillons (Figure 16)

Le pourcentage des surfaces qui correspondent aux acides aminés libres est entre 8,49% et 14,13%, ces résultats sont largement inférieurs aux résultats rapporté FALLICO *et al.* (2005), dans les chromatogrammes obtenus par RP-HPLC de la fraction soluble dans l'éthanol à 70% de *Ragusano*, les acides aminés libres présentent 49% et 51%, ce qui est expliqué par une protéolyse poussée des peptides en acides aminés par les différentes peptidases microbiennes. Les faibles proportions des acides aminés dans *bouhezza* serait dues aux faibles hydrolyses des peptides par les peptidases microbiennes, ou par leur métabolisation par les différentes flores pendant la maturation ou probablement par l'effet de l'égouttage en continue pendant l'affinage après les ajouts du *Lben*/lait. Et le rapport des surfaces des peptides hydrophobes par rapport aux peptides hydrophiles est entre 0,72 et 0,93 pour les six échantillons, ces valeurs sont proches à celles dans les six échantillons.

Dans les six échantillons de *bouhezza* il existe des peptides avec différentes hydrophobicités, qui serait due à l'hydrolyse des caséines ou les fragments caséiniques solubles à pH 4,6, ces peptides eux-même subissent une hydrolyse plus ou moins importante probablement par les peptidases microbiennes qui donnent des acides aminés, avec différentes proportions dans les six échantillons.

Conclusion

Conclusion

A travers cette recherche, nous apportons notre contribution à la caractérisation du fromage traditionnel *bouhezza* de ferme, cette caractérisation a porté sur quelques aspects et abouti aux conclusions suivantes.

D'une manière général, la caractérisation physico-chimique des six échantillons de ferme a permis de les décrire avec un extrait sec allant de 23,4% à 32,2% et un taux gras/sec entre 24,7% et 39,75%. Ils ont un pH faible d'environ 4, une acidité lactique entre 0,78% et 1,69%, un taux de sels entre 1,04% et 2,36% dans la matière humide et des valeurs en matières azotées totale entre 12,44 et 17,93 g par cent g de fromage.

Le premier aspect a concerné la caractérisation microbiologique : *bouhezza* est un fromage fabriqué à partir de lait cru nonensemencé et n'ayant subi aucun traitement thermique. Nous avons remarqué l'absence des trois types des bactéries pathogènes, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli O157 : H7* dans les six échantillons. Après le dénombrement des principales flores, nous avons constaté que la microflore de *bouhezza* est composée essentiellement par des bactéries lactiques (lactobacilles et streptocoques lactiques) dont la charge prédomine largement les autres flores dénombrées, avec environ 10^7 UFC/g à 10^8 UFC/g pour les mésophiles et 10^5 UFC/g à 10^7 UFC/g pour les thermophiles, et la flore mésophile totale de l'ordre de 10^7 UFC/g. Cependant, l'échantillon le plus âgé (f6 :120 jours) présente les charges les plus faibles pour les différentes flores. La flore fongique ne représente qu'une fraction très faible et les coliformes fécaux et totaux sont absents pour les six échantillons de ferme.

Une image globale des communautés bactériennes dominantes du *bouhezza* a été obtenue à l'aide de la technique PCR-TTGE. Le profil de la TTGE montre que l'écosystème bactérien du *bouhezza* de ferme n'est pas très riche ; entre trois et cinq bandes sont détectées dans cinq de nos différents échantillons. L'exception est enregistrée pour l'échantillon de 120 jours d'affinage qui présente 10 bandes. Deux bandes communes pour les six échantillons sont associées aux *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, comme des espèces dominantes. Une troisième bande qui correspondrait à la présence de *Lactobacillus helveticus* et/ou *Lactobacillus acidophilus* et/ou *Lactobacillus crispatus*, est observée pour les quatre échantillons f1, f2, f3 et f5. La bande qui représentant *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* est présente dans trois échantillons (Ech f1, Ech f2 et Ech f4). Une exception a été observée pour l'échantillon f6, le plus âgé qui montre dix bandes pouvant représentes jusqu'à sept genres différents. Malgré la non

identification de l'une de ces dix bandes, cela exprimerait la présence dans ce fromage un nombre des espèces allant de 10 à 15 participant à l'écosystème installé.

Le deuxième aspect qui a concerné la caractérisation de la protéolyse a révélé des taux de maturation de *bouhezza* relativement peu importants, variant de 8,49% à 16,23% en allant du plus jeune au plus âgé des échantillons. Le taux de l'azote non protéique dans les six échantillons se situe entre 5,66% et 13,67%, ce qui montre que la protéolyse dans *bouhezza* de ferme est relativement peu importante.

La protéolyse primaire des caséines de *bouhezza* par les protéinases indigènes du lait et/ou de la microflore, permet de donner différents fragments caséiniques insolubles à pH 4,6 détectés en PAGE-Urée et correspondent aux fragments : β -CN (f106-128), β -CN (f106-149), α -CN (1-192), les caséines- β (2, 3 et 1), α_{s1} -CN (102-199), α_{s1} I-CN (24-199), α_{s1} -CN (110-199) et α_{s1} CN (60-*), en plus des autres fragments α_{s1} (f^{*.*}).

Les analyses par RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6, solubles et insolubles dans l'éthanol à 70%, montrent que seuls les profils chromatographiques de la fraction insoluble dans l'éthanol pour les six échantillons, présentent des similarités dans la forme générale, caractérisés par des pics ayant des hauteurs élevées et des temps de rétention proches, contrairement des fractions solubles à pH 4,6 et solubles dans l'éthanol.

Dans les trois fractions les pourcentages des acides aminés libres sont les plus faibles par rapport aux pourcentages des peptides. Le pourcentage exprimant la part des peptides hydrophiles est plus élevé dans les deux fractions solubles, à pH 4,6 (entre 40,1% et 54,5%) et dans l'éthanol (entre 45,8% et 52,6%). Les peptides hydrophobes par contre, dominent dans la fraction insoluble dans l'éthanol (41,5% et 61,8%).

L'ensemble des résultats auxquels a abouti notre étude constitue une contribution de la caractérisation de *bouhezza* de ferme, qui mérite d'être complétée par d'autres études. En perspective il est intéressant

- d'élargir les analyses à des échantillons de différentes régions et à des fabrications au lait de chèvre ou de mélange à différents stades de maturation ;
- d'envisager des approches expérimentales pour expliquer l'effet de la pâte fromagère et/ou de l'écosystème microbien pendant l'affinage sur les germes pathogènes ;
- d'approfondir la caractérisation microbiologique pour expliquer le rôle de l'écosystème de la *chekoua* et son interaction avec celui de *bouhezza* sur l'affinage.

Références
Bibliographiques

- ABRIOUEL H., MARTIN-PLATERO, A., MAQUEDA, M., VALDIVIA, E., MARTINEZ-BUENO, M., 2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 127 (3) : 200–208.
- ADLER-NISSEN J., 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science, London & New York.
- AISSAOUI ZITOUN O., 2004. Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle algériens 'Bouhezza'. *Mémoire de magister*, Université Mentouri Constantine, 134p.
- AISSAOUI ZITOUN O. et ZIDOUNE M.N., 2006. Le fromage traditionnel algérien bouhezza. *Séminaire d'Animation Régional Technologies douces et procédés de séparation*. AUF-GP3A-INSAT, Tunis, Tunisie,.118-124.
- AISSAOUI ZITOUN O., BENATALLAH L., GHENNAM E.H. et ZIDOUNE M.N., 2011a. Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened bouhezza cheese. *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.9 (2)*:.196-100.
- AISSAOUI ZITOUN O., FUCA N., PEDILIGGIERI C., TUMINELLO L., ZIDOUNE M.N., LICITRA G. and CARPINO S., 2011b. Ecosystem characterization of 'goatskin' biofilm. *Poster IDF World Dairy Congress*, Athens, Greece, May 16-18, 2011.
- AISSAOUI ZITOUN O., (en cours), Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle bouhezza. *Thèse de doctorat*. INATAA, Université Mentouri Constantine.
- ALAIS C. et LINDEN G., 1997. Abrège de biochimie alimentaire. 4^{ème} édition. Sepsac, Paris, 248p
- ALBENZIO M., CORBO M.R., REHMAN S.U., FOX P.F., DE ANGELIS M., CORSETTI A., SEVI A., GOBBETTI M., 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology.* 67 : 35–48
- AMIOT J., FOURNIER S., LEBOEUF Y., PAQUIN P. ET SIMPSON R., 2002. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *In* Vignola C.C., Science et technologie du lait transformation du lait. Fondation de technologie laitière du Québec, 395p.
- ANDREWS A.T., 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on the caseins. *J. Dairy Res.* 50 : 45–55.
- ANONYME, 2007. DuPont Qualicon BAX[®] System User Guide, I-1 p.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis. 15th ed., Washington, D.C.
- ARDO Y., 2001. Cheese ripening. General mechanisms and specific cheese varieties. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 369 :.7-12.
- ARDÖ Y., CHATTERTON D.E.W. and VARMING C., 2011. Chromatographic Methods. pp.169-176 *In* Fuquay, J.W., Fox, P.H., McSweeney, P.L.H. Encyclopedia of Dairy Science, Ed., Elsevier science. Ltd. 4068p.

- AUGUSTIN J-C. and CARLIER V., 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 56 : 29–51.
- AZIZI S. ET KERTICHE L., 2009. Suivi des caractéristiques microbiologiques de *bouhezza* au lait de vache et de mélange (vache et chèvre). *Mémoire d'ingéniorat*, INATAA-Université Mentouri Constantine, 51p.
- BAKER G.C., SMITH J.J. and COWAN D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*. 55 : 541–555.
- BARBANO D.M., 1986. Titratable acidity and lactose/galactose determination of cheese. *J. Dairy Sci.* 68 : 50-57.
- BARRETT E.M., KELLY A.L., MCSWEENEY P.L.H. and FOX P.E. 1999. Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 9 : 421-427.
- BEDIARE N. et BEN HANAYA H., 2006. Caractérisation physicochimique et microbiologique du fromage traditionnelle algériens 'Bouhezza' de fermes et de commerce. *Mémoire d'ingéniorat*, INATAA, Université Mentouri Constantine, 57p.
- BENMESSAI W. et FETHALLAH Z., 2009. Suivi des caractéristiques physico-chimiques de *Bouhezza* au lait de vache et de mélange (vache et chèvre). *Mémoire d'ingéniorat*, Université Mentouri Constantine, 86p.
- BERESFORD T. and WILLIAMS A., 2004. The Microbiology of Cheese Ripening, pp.242-272. *In* Fox P.H., McSweeney P.L.H., Cogan T., Guinee T. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 564p.
- BERESFORD T.P., FITZIMONS N.A., BRENNAN N.L. and COGAN T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11: pp.259–274.
- BEUVIER E. and BUCHIN S., 2004. Raw Milk Cheeses. pp.273-299. *In* Fox P.H., McSweeney P.L.H., Cogan T., Guinee T. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 564p.
- BLAIOTTA G., PENNACCHIA C., VILLANI F., RICCIARDI A., TOFALO R. and PARENTE E., 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 97 : pp.271-284.
- BLAKESLEY R.W. and BOEZI J.A., 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250, *Anal Biochem*. 82 : 580-581.
- BROOME M.C. and POWELL I.B., 2011. Starter Cultures: General Aspects, pp.552-558 *In* Fuquay, J.W., Fox, P.H., McSweeney, P.L.H. *Encyclopedia of Dairy Science*, Ed., Elsevier science. Ltd.
- BRULE G., LENOIR J. et REMEUF F., 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait *In* Le fromage. Ed., A. Eck, 3^{ème} Ed., Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp.7-41.

- BYNUM O.G. and BARBANO D.M., 1985. Whole Milk Reverse Osmosis Retentates for Cheddar Cheese Manufacture: Chemical Changes During Aging. *J. Dairy Sci.* 68 : 1-10.
- CALVO M.V., CASTILLO I., DIAZ-BARCOS V., REQUEN T. and FONTECHA J., 2007. Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. *Food Chemistry*, 102 : 917-924.
- CARERI M., SPAGNOLI S., PANARI G., ZANNONI M. and BARBIERI G., 1996. Chemical parameters of the non-volatile fraction of ripened Parmigiano-Reggiano cheese. *Int. Dairy J.* 6 : 147-155.
- CASALTA E., NOËL Y., LE BARS D., CARRE C., ACHILLEOS C. and MAROSELLI M-X. 2001. Caractérisation du fromage *Bastelicaccia*. *Le Lait*, 81: 529–546.
- CAYOT P. et LORIENT D., 1998. Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Technique et documentation, Lavoisier, 363p.
- CHAMBA J.F., DELACROIX-BUCHET A., BERDAGUE J.L. et CLEMENT J.F., 1994. Une approche globale de la caractérisation des fromages : l'exemple du fromage de Beaufort, *Sciences des Aliments* 14 : 581-590.
- CHAUMANDE B., 2011. Apport des analyses protéomiques et métalloprotéomique pour l'étude de la géophagie. *Thèse de doctorat*. Université de Strasbourg. 258p.
- CHRISTENSEN T. M. I. E., Kristiansen K. R., Madsen J. S. 1989. Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. *J. Dairy Res.*, 56 : 823-828.
- COGAN T.M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Kalantzopoulos G., Ledda A. and Medina M., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64: pp.409-421.
- COGAN T.M., 2011. Microbiology of Cheese, pp.625-636, *In* Fuquay J.W., Fox P.H., McSweeney P.L.H. Encyclopedia of Dairy Science, Ed., Elsevier science. Ltd.
- COKER C.J., CRAWFORD R.A., JOHNSTON K.A., SINGH H., CREAMER L.K., 2005. Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data—a review. *International Dairy Journal*. 15 : 631-643.
- COLLINS Y.F., MCSWEENEY P.L.H. and WILKINSON M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13 : 841–866.
- CORROLER D., DESMASURES N. and GUEGUEN M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51 : 91-99.
- CORROLER D., MANGIN I., DESMASURES N. and GUEGUEN M., 1998. An Ecological study of Lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 : 4729-4735.

- CORSETTI C. and VALMORRI S., 2011. *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. pp.2097-2104. *In* Fuquay J.W., Fox P.H., McSweeney P.L.H. Encyclopedia of Dairy Science, Ed., Elsevier science. Ltd.
- COURTIN P., NARDI M, WEGMANN U., JOUTSJOK V., OGIER J.C., GRIPON J.C., PALVA A., HENRICH B. AND MONNET V., 2002. Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactobacillus lactis* proteolytic system with *Lactobacillus* peptidases. *Int. Dairy J.*, 12 : 447-454.
- CREAMER L.K., 2002. Casein nomenclature, structure and association properties. *In* Encyclopedia of Dairy Science, Ed., H. Royinski, J. Fuquay, and P. Fox, Elsevier science Ltd, pp.1895-1902.
- CROW V.L., COOLBEAR T., GOPAL P.K., MARTLEY F.G., MC KAY L.L. AND RIEPE H., 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.*, 5: 855-875.
- DAMERVAL C., VIENNE D., ZIVY M., TARROUX P. ET VINCENS P., 1993. Electrophorèse bidimensionnelle des protéines, *Biofutur*. 123 : 3-10.
- DE BUYSER M.-L., DUFOUR B., MAIRE M. AND LAFARGE V., 2001. Implication of milk and milk products in food borne diseases in France and in different industrialized countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67 : 1-17.
- DE LLANO D.G., POLO C.M. and RAMO M., 1995. Study of Proteolysis in Liquid Chromatography Artisanal Cheeses: High Performance of Peptides. *J Dairy Sci* 78:1018-1024.
- DE WIT M., OSTHOFF G., VILJOEN B.C., HUGO A., 2005. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme and Microbial Technology.* 37 : 606–616
- DELBES C. AND MONTEL M.C., 2005. Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Letter and Applied Microbiology.* 41: 169-74.
- DI CAGNO R., BANKSB J., SHEEHAN L., FOX P.F., BRECHANY E.Y., CORSETT A., GOBBETTI M. 2003. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal.* 13 : 961–972.
- DRIAD Y., 2009. Stabilité du paracétamol : Application à un sachet produit en industrie pharmaceutique. *Thèse de doctorat.* Université Henri Poincaré – Nancy 1 ; 111p.
- ECK A., 1990. Le Fromage. 3^{ème} Edition, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.
- EIGEL W.N., BUTLER J.E., EMSTROM C.A., FARRELL J.H.M., HARWALKAR V.R., JENNESS R. & MCWHITNEY R., 1984. Nomenclature of protein cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, pp.1599-1631.
- EL CHAFII A., 1987. *Thaourat El Aurès* (1916). Thèse approfondie en histoire moderne de l'Algérie. Institut d'histoire. Université D'Alger.

- ERCOLINI D. AND COPPOLA S., 2011. Use Of Microbial Dna Fingerprinting. PP.632-639. *In* FUQUAY J.W., FOX P.H., MCSWEENEY P.L.H. Encyclopedia of Dairy Science, Ed., Elsevier science. Ltd.
- ERCOLINI D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods*. 56 : pp.297–314.
- ERCOLINI D., FRISSE G., MAURIELLO G., SALVATORE F. and COPPOLA S., 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 96, pp.263–270.
- EXTERKATE E.A. and ALTING A.C., 1995. The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *Int. Dairy J.* 5 : pp.15-28.
- Exterkate F.A., Lagerwerf F.M. and Haverkamp J., 1997. The selectivity of chymosin action on alpha (s_1)- and beta-caseins in solution is modulated in cheese, *Int. Dairy J.* 7, 47-54.
- FALLICO V., MCSWEENEY P.L.H., SIEBERT K.J., HORNE J., CARPINO S. and LICITRA G., 2004. Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.* 87 : 3138–3152.
- FALLICO, V., MCSWEENEY, P.L.H., K.J., HORNE, PIDILIGGIERI C., HANONE J., CARPINO, S., LICITRA, G. 2005. Evaluation of biternesse in Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.* 88 : 1288–1300.
- FARRELL JR. H.M., JIMENEZ-FLORES R., BLECK G.T., BROWN E.M., BUTLER J.E., CREAMERL.K., HICKS C.L., HOLLARC.M., NG-KWAI-HANG K.F. and SWAISGOOD H.E. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science.* 87, 1641-1674.
- FITZGERALD R.J., 1998. Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal.* 8 : 451-457.
- FOLKERTSMA B., FOX P. F. and MCSWEENEY P. L. H., 1997. Accelerated Ripening of Cheddar Cheese at Elevated Temperatures. *Inl. Dairy Journal.* 6 : 1117- 1134
- FOX P. F., MCSWEENEY P. L. H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International,* 12: 457-509.
- FOX P. F., 2003. Significance of Indigenous Enzymes in Milk and Dairy Products. Pp.263-285. *In* Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S., Handbook of food enzymology. Marcel Dekker, Inc. NewYork Basel.
- FOX P.F. and BRODKORB A., 2008. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal.* 18 : 677– 684.
- FOX P.F. and MCSWEENEY P.L.H., 1998. Dairy chemistry and biochemistry. London: Blackie Academic & Professional. 396p.
- FOX P.F. and TARASSUK N.P., 1968. Bovine milk lipase. I. Isolation from skim milk. *Journal Dairy Science.* 51: pp.826-833.
- FOX P.F., 1982. Exogenous enzymes in dairy technology. *In* Utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Dupy P. Tec. et Doc., pp.135-157.

- FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M. and MCSWEENEY P.L.H., 2000. Fundamentals of cheese science. *Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc.*
- FOX P.F., and MCSWEENEY P.L.H., 2004. Cheese: an overview, pp.1-19. *In* : Fox P.H., McSweeney P.L.H., Cogan T., Guinee, T. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 564p.
- FRANCHIN P.R., OGLIARI P.J., ANDRADE D.F., CHIAPINOTO M., LEMOS G., REBELATTO M., DA SILVA I.G. and BATISTA C.R.V., 2006. Comparison of the Bax[®] system with an in-house MSR/V method for the detection of salmonella in chicken carcasses and pork meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37 : 521-526.
- FRANCIOSI E., SETTANNI L., CAVAZZA A. and POZNANSKI E., 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *Int. Dairy J.* 19 : 3-11.
- GALA E., LANDI S., SOLIERI L., NOCETTI M., PULVIRENTI A. and GIUDICI P., 2008. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125 (3) : 347-351.
- Genigeorgis C., Carniciu M., Dutulescu D. and Farver T.B., 1991. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4-30 °C. *Food Protection*.54 : 662-668.
- GIANNOU E., KAKUR A., MATIJASIC B.B., ROGELJ I. and SAMELIN J., 2009. Fate of *Listeria monocytogenes* on fully ripened Greek Graviera cheese stored at 4, 12, or 25 degrees C in air or vacuum packages: *in situ* PCR detection of a cocktail of bacteriocins potentially contributing to pathogen inhibition. *J. Food Prot.* 72 : 531-538.
- GOBBETTI M., LANCIOTTI R., DE ANGELIS M., ROSARIA-CORBO M., MASSINI R. and FOX P.F. 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 25 : 795-809.
- GOBBETTI M., LOWNEY S., SMACCHI E., BATTISTOTTI B., DAMIANI P., and FOX P.F., 1997. Microbiology and Biochemistry of Taleggio Cheese During Ripening. *J. Dairy Journal*. 7 : 509-517
- GORDON W.G., GROVES M.L., GREENBERG R., JONES S.B., KALEN E.B., PETERSON R.F. and TOWNSEND R.E. 1972. Probable identification of g-, TS-, R-, S-caseins as fragments of b-casein. *Journal of Dairy Science*. 55: 261-263.
- GOROSTIZA A., CICHOSCKI A.J., VALDUGA A.T., VALDUGA E., BERNARDO A. and FRESNO J.M., 2004. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry*. 85 : 407-414.
- GRAPPIN R., RANK T. and OLSON N.E., 1985. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*. 68: pp.531-540.
- GUILLOU H., PELISSIER J.P. et GRAPPIN R., 1986. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le lait*, 66 : 143-175.

- GUINEE T.P. and MCSWEENEY P.L.H., 2006. Significance of milk fat in cheese, pp.397-440. *In* Fox P.F., Mcsweeney P.L.H., Advanced Dairy Chemistry Vol. 2 : Lipids. Third Edition. Springer ScienceBusiness Media, Inc.
- GUIRAUD J.P., 2003. Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. 651p.
- HAYALOGLU A.A., Fox P.F., Guven M., Cakmakci S. 2007. Cheeses of Turkey: Review 1. Varieties ripened in goat-skin bags. *Le Lait*. 87 : 79–95.
- HAYALOGLU A.A., GUVENA M. and FOX P.F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese ‘Beyaz Peynir’. *International Dairy Journal*. 12 : 635–648.
- HAYALOGLU A.A., GUVENB M., FOXC P.F., HANNONC J.A. and MCSWEENEY P.L.H. 2004. Proteolysis in Turkish White-brined cheese made with defined strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*, 14 : 599–610.
- HENRI-DUBERNET S., DESMASURES N. and GUÉGUEN M., 2004. Culture-dependent and culture independent methods for molecular analysis of the diversity of *lactobacilli* in “Camembert de Normandie” cheese. *Le Lait*, 84 : 179-189.
- HERREROS M.A., FRESNO J.M., GONZALEZ PRIETO M.J. AND TORNADIJO M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13 : 469–479.
- HOLLAND R., LIU S.-Q. CROWA V.L., DELABRE M.-L., LUBBERS M., BENNETT M. and NORRIS G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*. 15 : 711-718.
- HOLZAPFEL W.H., GEISEN R. and SCHILLINGER U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J.Food Microbiol.* 24 : 343-362.
- HORNE D. S., 2002. Caseins, micellar structure. *In* : Roginski H., Fuquay J., and Fox P. F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1902–1909). London: Academic Press.
- HORNE S.D., 2006. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11 : 148–153.
- Irlinger F. and Mounier J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 142–148.
- IRLINGER F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de diversité des bactéries d'intérêt technologiques des surfaces des fromages. *Thèse de Microbiologie*. INA P-G, 172p.
- JANY J.L. and BARBIER G., 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese : review. *Food Microbiology*. 25 : 839– 848.
- JENSEN M.P., VOGENSEN F.K. and ARDO Y., 2009. Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *Int. Dairy J.* 19 : 661-668.
- KAMINOGAWA S., YAMAUCHI K., MISAWA A.S. and KOYA Y., 1980. Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 63 :1855-1877.

- KAWAI Y., TADOKORO K., KONOMI R., ITOH K., SAITO T., KITAZAWA H. and ITOH T. 1999. A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stages of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 82 : 481-485.
- KELLY A.L., O'FLAHERTY F. and FOX P.F., 2006. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal.* 16 : 563–572.
- KIKUCHI T., et TAKAFUJI S., 1971. Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques de la biochimie de l'affinage; *in* "Le Fromage". Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.
- LABORDA M.A. and RUBIOLO A.C., 1999. Proteolysis of fynbo cheese salted with NaCl/KCl and ripened at two temperatures. *Journal Of Food Science.* 64 (1) : 33-36.
- LAFARGE V., OGIER J.C., GIRARD V., MALADEN V., LEVEAU J. et DELACROIX-BUCHET A., 2004. Le potentiel de la TTGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. *Le Lait* 84 : 169-178.
- LARSEN L.B., BENFELDT C., RASMUSSE L.K. and PETERSEN T. E., 1996. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: Coagulation and milk protein degradation. *Journal of Dairy Research.* 63 : 119–130.
- LE MENS, P., 2006. Le gout et l'affinage des fromages. La biogenèse des arômes pendant l'affinage des fromages: " de la biodiversité microbiologique a la diversité des arômes". LOF Newsletter, N05, North East South West INTERREG IIC.
- Lemouchi L., 2007. Le fromage traditionnel *Bouhezza* : enquête dans la wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physicochimiques de deux fabrications. *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri Constantine, 65p.
- LENOIR J., LAMBERET G., SCHMIDT J.L., TOURNEUR C. 1985. La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur.* 41 : 23-50.
- LEONIL J., BOS C., MAOBOIS J-L., TOME D., 2001. Le lait est ses constituants : biodisponibilité et valeur nutritionnelle 1 protéines *In* : Lait, Nutrition et santé. Ed., G. Debry. Tec et Doc. P.41-83, 566p.
- LEROY F. and DE VUYST L., 2010. Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products, *Aust. J. Dairy Technol.* 65 : 143-149.
- LEUSCHNER R.G.K. and BOUGHTFLOWER M.P., 2002. Laboratory scale preparation of soft-cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella entericaserovars Typhimurium*, *Enteritidis* and *Dublin*. *J. Food Prot.* 65 : 508-514.
- LEVEAU J.Y., BOUX M. and DEROISSANT H., 1991. La flore lactique. *In* Bourgois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyses et de contrôles dans les IAA, Vol 3 : le contrôle microbiologique. 2^{ème} édition Tec. et Doc. APRIA 454p.
- LICITRA G., OGIER J.C., PARAYRE S., PEDILIGGIERI C., CARNEMOLLA T.M., FALENTIN H., MADEC M.N., CARPINO S. and LORTAL S., 2007. Variability of the bacterial biofilms of the "tina" wood vat used in the Ragusano cheese making process, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 : 6980–6987.

- LIU S-Q., HOLLAN R. and CROW V.L., 2001. Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal*. 11 : 27–35.
- LOPES M.F.S., PEREIRA C.I., RODRIGUES F.M.S., MARTINS M.P., MIMOSO M.C., BARROS T.C., MARQUES J.J., TENREIRO R.P., ALMEIDA J.S. and BARRETO CRESPO M.T., 1999. Registered designation of origin areas of fermented food products defined by microbial phenotypes and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4484–4489.
- LORTAL S. and CHAPOT-CHARTIER M.P., 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. Review. *International Dairy Journal* : 15 : 857-871.
- LUQUET F.M., 1990. Lait et Produits Laitiers vache, brebis, chèvre. Tome II, Technique et Documentation, 2^{ème} Edition, Lavoisier, Paris. 374p.
- LYNCH C.M., MCSWEENEY P.L.H., FOX P.F., COGAN T.M. and DRINAN F.D., 1996. Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 6 : 851-867.
- MALLATOU H., PAPPAS E.C. and BOUMBA V.A., 2004. Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 14: 977–987.
- MANNU L., COMUNIAN R., SCINTU M.F., 2000. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 10 : 383-389.
- MARCOS A., ESTEBAN M.A., LEON F. and FERNANDEZ-SALGUERO J., 1979. Electrophoretic pattern of European cheeses comparison and quantitation. *Journal of Dairy Science*, 62 : 892-898.
- MARILLEY L. and CASEY M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 90 : 139-159.
- MARINO M., MAIFRENI M. and RONDININI G., 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 133–140.
- MARSHALL R.T., 1993. Standard methods for the examination of dairy products, 16^{ème} Ed. 450p.
- MARTINEZ-CUESTA M.C., DE PALENCIA P.F., REQUENA T. and PELIAEZ C., 2001. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese : Review. *International Dairy Journal*, 11 : 577–585.
- MAS M., TABLA R., MORICHE J., ROA I., GONZALEZ J., REBOLLO J.E. and CACERES P., 2002. Ibore goat's milk cheese: microbiological and physico-chemical changes throughout ripening. *Le Lait*, 82: 579-587.
- MCSWEENEY P.L.H. and FOX P.F., 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le Lait* : 77 : 41-76.
- MCSWEENEY P.L.H. and SOUSA M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80 : 293-324.

- MCSWEENEY P.L.H., 2004. Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. pp 346-360 *In* Fox, P.H., McSweeney, P.L.H., Cogan, T., Guinee, T. (Eds.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier Academic Press, San Diego, 564p.
- MCSWEENEY P.L.H., 2011. Biochemistry of Cheese Ripening. pp 667-675. *In* :Fuquay, J.W., Fox, P.H., McSweeney, P.L.H. Encyclopedia of Dairy Science, Ed., Elsevier science. Ltd.
- MCSWEENEY P.L.H., FOX P. F., and OLSON N.F., 1995. Proteolysis of Bovine Caseins by Cathepsin D: Preliminary Observations and Comparison with Chymosin. *International Dairy Journal*. 5 : 321-336.
- MEDJOU DJ H., (en cours). Contribution et caractérisation du fromage traditionnel : *bouhezza*. Thèse de doctorat. INATAA, Université Mentouri Constantine.
- MESSENS W., ESTEPAR-GARCIA J., DEWETTINCK K. and HUYGHEBAERT A., 1999. Proteolysis of high-pressure treated Gouda cheese. *Int. Dairy J.* 9 : 775-782.
- MICHAEL M.J. and MØLLER G.M., 2006. PCR the basics. Second edition by Taylor & Francis Group. 292p.
- MICHAELIDOU A., KATSIARI M.C., KONDYLI E., VOUTSINAS L.P. and ALICHANIDIS E., 2003. Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *Int. Dairy J.* 13 : 179-189.
- MICHALSKI M., GASSI J., FAMELART M., LECONTE N., CAMIER B., MICHEL E. and BRIARD V., 2003. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Le Lait*. 83 : 131-143.
- MICHEL V., HAUWUY A. et CHAMBA J.F., 2001. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait*, 81 : 575-592.
- MICHEL V., VERDIER-METZ I., DELBES C., CHAMBA J.F. et MONTEL M.C., 2005. Diversité microbienne des laits crus: quels enjeux, quels risques, quels moyens de gestion. Colloque INRA-INAO.
- MOLIMARD P. and SPINNLER H.E., 1996. Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties: Review. *Journal of Dairy Science*, 79: 169-184.
- MOLLÉ D. and LÉONIL J., 1995. Heterogeneity of the bovine k-casein caseinomacropéptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 708 : 223-230.
- Montel M-C., Béranger C., Bonnemaire J., 2005. Un point sur : Les fermentations au service des produits de terroir. Ed Inra-Quae. Paris. 555p.
- MOONEY J. S., FOX P. F., HEALY A., and LEAVER J., 1998. Identification of the principal water-insoluble peptides in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 8 : 813-818.
- MOREA M., BARUZZI F. and COCCONCELLI P.S., 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*. 87; 574-582.

- NASCIMENTO M.S., MORENO I. and KUAYE A.Y., 2008. Applicability of bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. *Int. J. Dairy Technol.* 61 : 352-357.
- NEVILLE M.C. and JENSEN R.G., 1995. Hand book of milk, the physical proprieties of human and bovin milk. Ed JENSON. *Acadimic press* ; 592p.
- NG-KWAI-HANG K.F., 2003. Milk Proteins. Heterogeneity, Fractionation and Isolation. *In* Encyclopedia of Dairy Sciences, Roginski H., Fuquay J.W. & Fox P.F., editors. London: Academic Press, pp.1881–1894.
- NIKOLIC M., TERZIC-VIDOJEVIC A., JOVCIC B., BEGOVIC J., GOLIC N. and TOPISIROVIC L., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 122 (1–2) : 162–170.
- NIMER T., 2006. Caractérisations physicochimies du fromage traditionnel Algérien Bouhezza de ferme et de commerce. *Mémoire d'ingéniorat*, INATAA-Université Mentouri Constantine, 60p.
- OGIER J.C., LAFARGE V., GIRARD V., RAULT A., MALADEN V., GRUSS A., LEVEAU J. and DELACROIX-BUCHET A., 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 628–5643.
- OGIER J.C., SON O., GRUSS A., TAILLIEZ P. and DELACROIX-BUCHET A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8) : 3691-3701.
- OLIVECRONA T., VILARO S. and BENGTTSSON-OLIVECRONA G., 1992. Indigenous enzymes in milk: lipases. pp.292–310. *In* Fox P.F., ed. *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins*. London: Elsevier Applied Science.
- OUALI S., 2003. Qualité du fromage a pâte molle type Camembert fabriqué à la laiterie de *Draa Ben Khedda* : nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l'affinage et de l'entreposage réfrigéré du fromage. *Mémoire de magister*, Université Mentouri Constantine, 128p.
- PAPPA E.C., KANDARAKIS I.G., ZERFIRIDIS G.K., ANIFANTAKIS E.M. and SOTIRAKOGLU K., 2006. Influence of starter cultures on the proteolysis of Teleme cheese made from different types of milk. *Le Lait.* 86 : 273-290.
- PARAYRE S., FALENTIN H., MADEC M.N., SIVIERI K., LE DIZES A.S., SOHIER D. and LORTAL S., 2007. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products, *J. Microbiol. Methods.* 69 : 431–441.
- PARFAIT B. and VIDAUD D., 2002. Analyse des acides nucléiques. *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation.* 3315 : 1-16.
- PAVIA M., TRUJILLO A. J., GUAMIS B. and FERRAGUT V., 2000. Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *Journal of Dairy Science.* 83: 1441–1447.

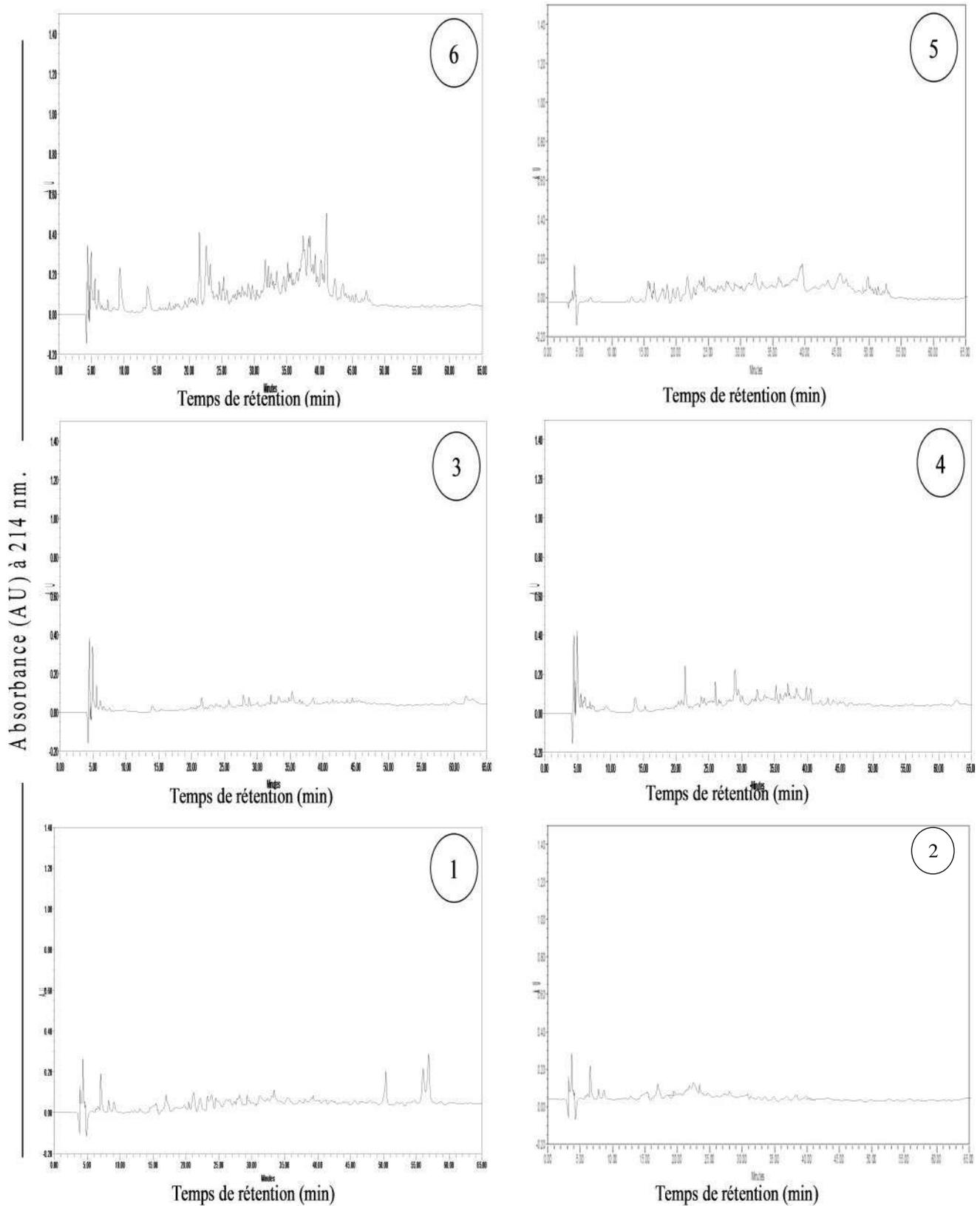
- PELAÉZ C. and REQUENA T., 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*. 15 : 831–844.
- PICON A., GAYA P. and NUNEZ M., 2007: Lowering hydrophobic peptides and increasing free amino acids in cheese made with a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein. *International Dairy Journal*. 17 : 218-225.
- PLACE R.B., HIESTAND D., GALLMANN H.R., TEUBER M., 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26 (1) : 30-37.
- POZNANSKI E., CAVAZZA A., CAPPÀ F. and COCCONCELLI P.S., 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92 : 141-151.
- PRIMSON S., TWYMAN R. et OLD R., 2004. Principe de génie génétique. 6^{ème} édition. Eds. De boeck. 400p.
- PRIPP A.H., REHMAN S-UR., MCSWEENEY P.L.H., SØRHAUG T. and FOX P.F., 2000. Comparative study by multivariate statistical analysis of proteolysis in a sodium caseinate solution under cheese-like conditions caused by strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*. 10 : 25-31
- PSONI L., TZANETAKIS N. and LITOPOULOU-TZANETAKI E., 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, 20 : 575-582.
- PUHAN Z. and STEFEN C., 1967. Studie über die proteolytische Wirkung einiger mikrobieller Labersatzstoffe auf die Proteine der Milch vom Moment des Einlabens bis zum reifen Kase. *Schweizerische Milchzeitung, Wissenschaftliche Beilage*, 56: 937-952.
- QUINTO M., SPADACCINO G., ROTUNNO T., SINIGAGLIA M., CICCARONE C., P.F. FOX. 2007. Effects of different surface treatments on ripening of Canestrato Pugliese cheese. *International Dairy Journal*. 17 : 1240–1247.
- RACHEF R., 2006. Caractérisation microbiologique du fromage traditionnel algérien 'bouhezza' de ferme et de commerce (wilaya de Batna et d'Oum El Bouaghi). *Mémoire d'ingénieur*, INATAA-Université Mentouri Constantine, 56p.
- RAMET J.P., 1987. La préparation du caillé. *In* Le Fromage A. Eck 2^{ème} édition Tec. et Doc.
- RANDAZZO C.L., CAGGIA C. and NEVIANI E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78 : 1–9.
- RANDAZZO C.L., VAUGHAN E.E. and CAGGIA C., 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *Int. J. Food Microbiol.* 109 (12) : 1–8.
- RANK T.C., GRAPPIN R. and OLSON N.E., 1985. Secondary proteolysis of cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science*. 68 : 801-805.

- REHMAN S-UR and FOX P.E., 2002. Effect of added of *o*-ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. *Food Chem.* 76 : 21-26.
- REHMAN S-UR., MCSWEENEY P.L.H., BANKS J.M., BRECHANY E.Y., MUIR D.D., FOX P.F., 2000. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal.* 10 : 33-44.
- REVILLE W.J. and FOX P.F., 1978. Soluble protein in Cheddar cheese: A comparison of analytical methods. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 2 : 67-76.
- RIBADEAU-DUMAS B. AND GRAPPIN R. 1989. Milk protein analysis. *Le Lait.* 69 : 357-416.
- ROHM H., JAROQ D., ROCKENBAUER C., RIEDLER-HELLRIGL M., UNIACKE-LOWEH T., and FOX P. F., 1996. Comparison of Ethanol and Trichloroacetic Acid Fractionation for Measurement of Proteolysis in Emmental Cheese. *Inr. Dairy Journal.* 6 : 1069-1077.
- ROUDJ S., BELKHEIR K., ZADI-KARAM H. and KARAM N-E., 2009. Proteolysis and autolysis Properties of two *Lactobacilli* isolated from camel milk of South-Western Algeria. *European Journal of Scientific Research.* Vol. 34 No.2 : 18-227.
- SARANTINOPOULOS R., KALANTZOPOULOS G. and TSAKALIDOU E., 2002. Effect of *Enterococcus faecium* microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 76 : 93-105.
- SCHEMID R.D., 2005. Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Edition Flammarion. Paris, 335p.
- SCHNURER J. and MAGNUSSON J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16 : 70-78.
- SCRIBAN R., 1999. Biotechnologie. 5^{ème} édition. Eds, Tec. Et Doc. Paris. 1017p.
- SERHAN M., 2008. Valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation en fromage *Darfiyeh* et établissement de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine. *Thèse de doctorat.* Institut National Polytechnique de Lorraine, 199p.
- SERHAN M., CAILLIEZ-GRIMAL C., BORGES F., REVOL-JUNELLES A.M., HOSRI C. and JACQUES FANNI J., 2009. Bacterial diversity of *Darfiyeh*, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiology.* 26 : 645–652.
- SERHAN M., LINDER M., HOSRI C. AND JACQUES FANNI J., 2010. Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of *Darfiyeh*, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Research.* 90 : 75-82.
- SETTANNI L. and MOSCHETTI G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology,* 27 : 691-697.
- SIEUWERTS S., DE BOK F.A., HUGENHOLTZ J. and VAN HYLCKAMAVLIEG J.E.T., 2008. Unravelling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Env. Microbiol,* 74 : 4997-5007.

- SMIT G., VERHEUL A., KRANENBURG R.V., AYAD E., SIEZEN R. and WIM ENGELS W., 2000. Cheese flavor development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*, 33 : 153-160.
- SNYDER R.L., KIRKLAND J.J. AND DOLAN J.W., 2010. Introduction to modern liquid chromatography. Third Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 957p.
- SOUSA M.J. and MALCATA X., 1997. Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis. *Food Chem.* 59 : 427-432.
- SOUSA M.J. and MCSWEENEY P.L.H., 2001. Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camemberttype cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.* 40 : 83-95.
- SOUSA M.J., ARDO Y. and MCSWEENEY P.L.H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal.* 11 : 327-345.
- SUTTON K., SUTTON R.M.C. and CARUSO J.A., 1997. Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 789 : 85–126.
- SWAISGOOD H.E., 1992. Chemistry of the caseins. *In* Advance Dairy Chemistry-I: Proteins. Fox P. F., Editor. New York: *Elsevier Applied Science*, pp.63-110.
- TAN P.S.T., POOLMAN B. and KONINGS W.N. 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 60 : 269-286.
- TEJADA L., ABELAN A., CAYUELA J.M., MARTÍNEZ-CACHA A. and FERANDEZ-SALGUERO J., 2008. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18: 139–146.
- TEMMERMAN R., HUYS G. and SWINGS J., 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci. Tech.* 15 : 348-359
- TERZIC-VIDOJEVIC A., VUKASINOVIC M., VELJOVIC K., OSTOJIC M. and TOPISIROVIC L., 2007. Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114 : 36–42.
- TIRELI A., 1998. Improved method for the Determination of furosine in food by capillary electrophoresis. *Journal of Food Protection*, 61(10) : 1400-1404.
- TOUATI T., 2008. Evolution des flores microbiennes du fromage traditionnel *bouhezza* durant 70 jours et identification de sa flore lactique. *Mémoire d'ingénieur*, INATAA- Université Mentouri Constantine, 51p.
- TOZLOVANU M., 2008. Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérigènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. *Thèse de doctorat*. Institut National Polytechnique de Toulouse. 261p.
- TRIEU-CUOT P. and GRIPON J.C., 1982. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *J Dairy Res* 49 : 501-510.

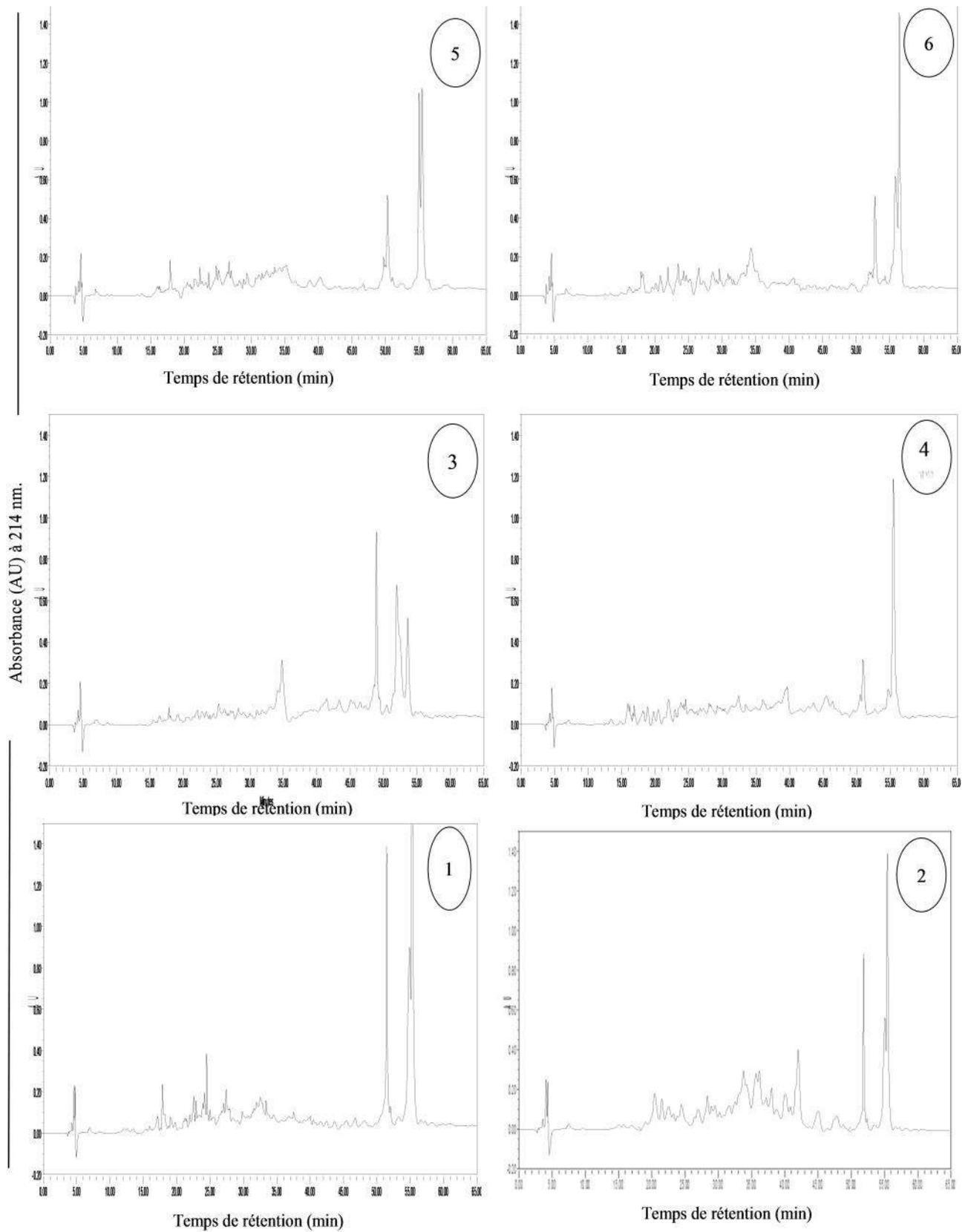
- UGARTE M.B., GUGLIELMOTTI D., GIRAFFA G., REINHEIMER J. and HYNES E., 2006. Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *Journal of Food Protection*, 69: 2983–2991.
- UPADHYAY V.K. MCSWEENEY P.L.H. MAGBOUL A.A.A. and FOX P.F., 2004. pp 390-434 *In* Fox P.H., McSweeney P.L.H., Cogan T., Guinee T. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 564p.
- VASILJEVIC T., SHAH N.P. and JELEN P., 2005. Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 as affected by different neutralizers. *Aust. J. Dairy Technol.* 60 : 3-9.
- VEISSEYRE R., 1979. La technologie du fromage, 3^{ème} ed., la maison Rustique, Paris, 714p.
- VIVAR-QUINTANA A. M., BLANCO M.A., L PEZ I., REVILLA I., GONZALEZ-MARTÍN I., HERNINDEZ-HIERRO J. M. and GONZALEZ-PEREZ C., 2009. Seasonal Evolution of Hydrophilic and Hydrophobic Peptide Contents in Cheeses Made from Ewe's Goat's or Cow's Milk. *Czech J. Food Sci.* V. 27, Special Issue :106-108.
- WALLACE J. M., et FOX P. F., 1996. Effect of Adding Free Amino Acids to Cheddar Cheese Curd on Proteolysis, Flavour and Texture Development. *Inr. Dairy Journal.* 7 : 157-167.
- WEIMER B., DIAS B. and UMMADI M., 1997. Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence cheddar cheese ripening. *Le Lait*, 77 : 383-398.
- ZAIDI O., ZERTAL M. ET ZIDOUNE M.N., 2000. Présentation d'un fromage traditionnel *bouhezza*. *Journal Algérien de Médecine.* 2: 96-101.
- ZAIDI O., 2002. Caractérisation du fromage traditionnel *Bouhezza* ; caractérisation physicochimique et microbiologique. *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri Constantine, 51p.
- ZARPOUTIS I.V., MCSWEENEY P.L.H., Fox P.E., 1997. Proteolysis in blue-veined cheese: an intervarietal study. *Irish J. Agric. Food Res.* 36 : 219-229.

Annexes



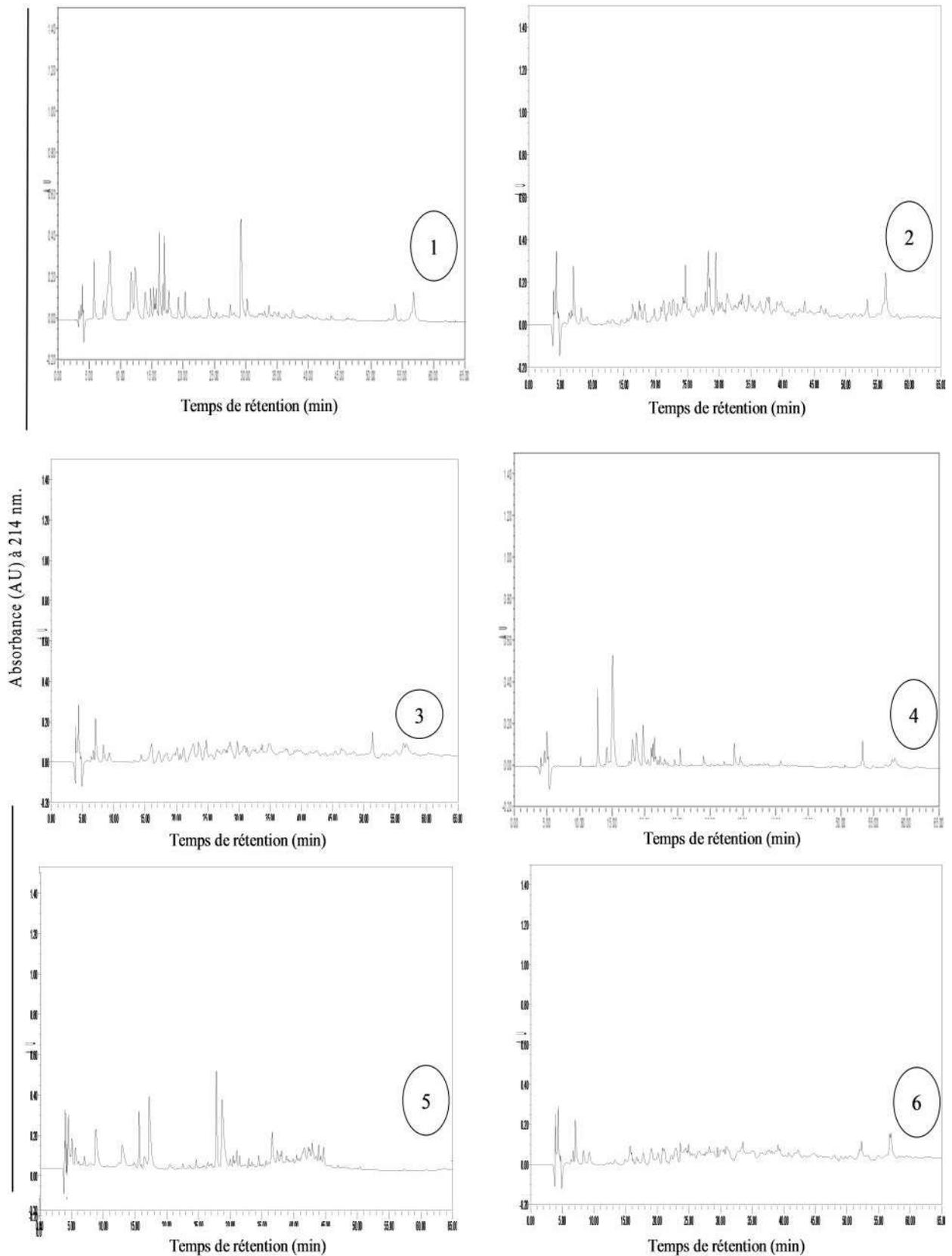
Annexe 1. Profils obtenus par RP-HPLC des fractions solubles à pH 4,6. Pour les six échantillons de *Bouhezza* de ferme

1.Ech f1, 2. Ech f2, 3. Echf3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6.



Annexe 2. Profils obtenus par RP-HPLC de la fraction azotée insoluble dans l'éthanol à 70% pour les six échantillons de *bouhezza*.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3. Echf3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6.



Annexe 3. Profils obtenus par RP-HPLC de la fraction soluble dans l'éthanol à 70% pour les six échantillons de *bouhezza*.

1. Ech f1, 2. Ech f2, 3. Echf3, 4. Ech f4, 5. Ech f5, 6. Ech f6.

بوهزة هو جبن تقليدي في منطقة الشاوية في الشرق الجزائري. الهدف من هذا العمل هو الإسهام تمييز بوهزة من الناحية المكر وبيولوجية و انحلال بروتينات هذا الجبن.

في هذا العمل قمنا بجمع ستة عينات من بوهزة من عدة مناطق ريفية بولاية . أظهرت طريقة البكتيري الأساسية, ميكروفلور بوهزة يتكون من البكتيريا اللبنية : المكورات العقدية و العصيات اللبنية. بخصوص الفطريات أنها لا تمثل صغير جدا من .
الغيا الكلي للقولونيات الكلية و البرازية. طريقة BAX[®] system غياب
التالية : *Escherichia coli O157: H7* *Salmonella* *Listeria monocytogenes*

البكتيرية بوهزة بواسطة تقنية PCR- TTGE (Temporal) أظهرت النظام الإيكولوجي البكتيري ليس , هيمنة *Lactobacillus plantarum* *Lactococcus lactis subsp. cremoris* في العينات الستة ثم تأتي *Lactococcus crispatus* / *Lactococcus acidophilus* / *Lactococcus Helveticus* عينات *Staphylococcus equorum subsp. linens* .

الانحلال البروتيني لجبن بوهزة نسبيا ضعيف نسبيا, حيث سجلنا نضوج تتراوح بين 8.49 و 16.23 للعينات الستة. بواسطة الهجرة الكهربائية (PAGE-Urea) البروتيني غير إنزيمات الحليب / ميكروفلور بوهزة. 4.6 بروتينات الكازين الناتجة عن

التحليل الكروماتوغرافي بواسطة ية RP-HPLC للأجزاء البروتينية التي غير الإيثانول 70 تبين أنه التشكيلات (profils) الكروماتوغرافي غير قابلة الإيثانول ست عينات تظهر تشابهات مهمة. النسب المئوية الأمينية النسب المئوية لببتيدات.

النسبة المئوية لببتيدات (40.1 54.5) . الأزوتية 4.6 45.8 52.6 للأجزاء البروتينية التي للإيثانول). ية الببتيدات الغير محبة للماء غير قابل للذوبان في الإيثانول (بين 41.5 61.8) .

: تقليدي علم الأحياء المجهرية، التحلل البروتيني بوهزة , PAGE-Urée PCR-TTGE , RP-HPLC.

Abstract

Bouhezza is a traditional cheese known in the area of "chaouia", in the east of Algeria. The aim of this study was to contribute to the characterization of microbiological and proteolysis of *Bouhezza* cheese of farm.

Six samples of *Bouhezza* cheese have been collected in the rural areas in the wilaya of Oum El Bouaghi. A count of the principal microbial groups indicates that the microflora of bouhezza was consists essentially of lactic acid bacteria (lactobacilli and lactic streptococci). Fungal flora represents only a very small fraction of microbial populations, total and fecal coliform are absent. The detection of the three pathogens by BAX[®] system method has demonstrated the absence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in the six samples of *bouhezza*.

A global picture of bacterial communities of *bouhezza* is carried out by the PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis, showed that the bacterial ecosystem is not very rich, with a dominance principally of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in all samples, and secondarily of *Lactococcus helveticus* and/or *Lactococcus acidophilus* and/or *Lactococcus crispatus* in four samples. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* are present in three others.

Proteolysis of *bouhezza* is not very large, with a rate of maturation which varies from 8.49% to 16.23% for the six samples. Electrophoretic separation of the insoluble nitrogen fraction at pH 4.6 by urea-PAGE detects different bands representing the diversity of casein fragments resulting from hydrolysis of casein by enzymes from the milk and/or from microflora of *bouhezza*.

The analyses by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography of the fractions soluble at pH 4.6, soluble and insoluble in 70% of ethanol, show that only the chromatographic profiles of the ethanol insoluble fraction of six samples show similarities. The percentages of free amino acids in the three fractions are smaller compared to the percentages of peptides. The percentage of hydrophilic peptides is higher in both soluble fractions (40.1% to 54.5% for the soluble fraction at pH 4.6 and 45.8% to 52.6% for the soluble fraction of ethanol). However the proportion of hydrophobic peptides is higher in the insoluble fraction in ethanol (between 41.5% and 61.8%).

Keywords: traditional cheese, *Bouhezza*, ripening, microbiology, proteolysis, PCR-TTGE, RP-HPLC, PAGE-Urea.

Résumé

Bouhezza est un fromage de terroir, connu depuis longtemps dans la région des « *chaouia* » à l'est algérien. Ce travail a pour objectif principal d'apporter une contribution à la caractérisation de *bouhezza* de ferme, au point de vue microbiologique et de la protéolyse de ce fromage.

Nous avons collecté six échantillons de *bouhezza* de fermes des régions rurales de la wilaya d'Oum El Bouaghi. Un dénombrement des principaux groupes microbiens montre que la microflore de *bouhezza* est constituée essentiellement par les bactéries lactiques : lactobacilles et streptocoques lactiques. La flore fongique ne représente qu'une très faible fraction des populations microbiennes et les coliformes fécaux et totaux sont absents. La détection par la méthode système BAX[®] a démontré l'absence des trois pathogènes ; *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157: H7.

Une image globale des communautés bactériennes de *bouhezza* est réalisée par la technique PCR-*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*, et a montré que l'écosystème bactérien n'est pas très riche, avec une dominance principalement de *Lactobacillus plantarum* et de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* dans les six échantillons, et secondairement de *Lactococcus Helveticus* et/ou *Lactococcus acidophilus* et/ou *Lactococcus crispatus*, dans quatre échantillons et *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* dans trois autres.

La protéolyse de *bouhezza* est peu importante, avec un taux de maturation qui varie de 8,49% à 16,23% pour les six échantillons. La séparation électrophorétique de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 par PAGE-Urée permet de détecter différentes bandes représentant la diversité des fragments caséiniques résultants de l'hydrolyse des caséines par les enzymes du lait et/ou de la microflore de *bouhezza*

Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse des fractions solubles à pH 4,6, solubles et insolubles dans l'éthanol à 70%, montrent que seuls les profils chromatographiques de la fraction insoluble dans l'éthanol des six échantillons présentent des similarités importantes. Les pourcentages des acides aminés libres dans les trois fractions sont plus faibles par rapport aux pourcentages des peptides. Le pourcentage des peptides hydrophiles est plus élevé dans les deux fractions solubles (40,1% à 54,5% pour la fraction soluble à pH 4,6 et 45,8% à 52,6% pour la fraction soluble en éthanol). Cependant le pourcentage des peptides hydrophobes est plus élevé dans la fraction insoluble dans l'éthanol (entre 41,5% et 61,8%).

Mots clés : fromage traditionnel, *Bouhezza*, affinage, microbiologie, protéolyse, PCR-TTGE, RP-HPLC, PAGE-Urée.