

N° d'Ordre : *الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية*  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT Choisissez un élément.

# Mémoire

*De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master*

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : Microbiologie Appliquée

Intitulé du thème :

## Contribution à l'étude de microflores utiles du fromage à pâte molle type Camembert

Présenté par : **Melle Tadj Sara**

**Melle BenrabeH Hanane**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : **Mme** Boussmaha Marrouki L (M.C.A/ UDL/SBA)

Examineur : **Mme** Kara Ibetsem (M.C.B/ UDL/SBA)

Promoteur : **Mr** Marroki Ahmed (M.C.A/ UDL/SBA)

Co-Promoteur : Choisissez un élément. Cliquez ici pour taper du texte. ( Choisissez un  
élément./ Choisissez un élément.)

**Année universitaire 2019 - 2020**

**Session** : « Septembre »

## DEDICACE

*A*vec un énorme plaisir et un cœur ouvert, J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à :

*Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.*

*A mes parents, la femme la plus patiente, ma très chère MAMA, source d'affection de courage et d'inspiration qui a autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour.*

*Mon idéal, l'être le plus généreux, mon cher PAPA, source de respect, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui m'a toujours apporté, qui ont été toujours à mes côtés pour terminer mes études.*

*Merci Papa et Maman « j'espère que vous êtes fiers de moi »*

*Je vous aime beaucoup.*

*A Mes chères sœurs BOUCHRA, RIHAB et la petite AMIRA;*

*A toute ma famille paternelle et maternelle oncles et tantes, cousins et cousines*

*A ma camarade et binôme HANANE et toute sa famille ;*

*Une spéciale dédicace à mes collègues: KARIMA, JAMILA, IKREM et MARWA.*

*Sans oublier mes amies de section microbiologie appliquée promo 2020/2021.*

*Mes enseignants pendant les Cinq années de formation et surtout mon encadreur*

*Dr. MARROUKIA*



*SARA*

## Dédicace

**E**n ce jour solennel qui mémorise la fin de mes études, Je m'incline devant Allah Tout-puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

**M**es parents chéries pour leur sacrifice, leurs soutiens moral et financier et affectif tout au long de mon parcours scolaire et à ma sœur qui a été toujours présente à mes côtés et qui m'a soutenu.

**M**erci beaucoup PAPA et MAMA je vous aime beaucoup.

**J**e tiens à remercier mon beau-frère MOHAMED pour sa participation.

**M**es deux adorables sœurs IMEN et la petite NESRINE.

**A** toute ma famille paternelle et maternelle.

**M**a camarade et binôme SARA pour sa patience et son soutien moral durant toute notre année universitaire et à sa famille.

**T**ous mes amis(es) et en particulier KARIMA, KHADIJA et LEILA en témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble.

**S**ans oublier la promotion de Microbiologie Appliquée 2020.

**A** tous ceux que je porte dans mon cœur. Sans oublier tous les professeurs de l'enseignement supérieur et surtout mon encadreur **Dr. MARROUKI A.**



**HANANE**



## REMERCIEMENTS



Nos remerciements s'adressent en premier lieu à l'éternel Dieu tout Puissant pour la patience et la santé qui nous ont été indispensables au long de notre parcours et à nos chers parents sans qui rien n'aurait été possible.

Nous tenons à remercier profondément le membre de jury Mme **KARA IBTESSEM**, examinatrice, Mme **BOUSSMAHA MARROUKI LEILA**, présidente d'avoir accepté de critiquer et d'améliorer ce travail.

Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur **Mr MARROUKI** pour son aide précieux, ses orientations, ses conseils éclairés et le temps qu'elle a accordé pour notre encadrement.

Nous adressons nos vifs remerciements à **Mr CHARGI ABD ELGHANI** gérant de la laiterie de **TASSALA** de nous avoir accueilli au sein de son entreprise, de nous ouvert ses portes et donné l'opportunité de réaliser ce stage.

Nos vifs remerciements s'adressent au personnel du laboratoire de la microbiologie de la laiterie de **TASSALA** à **MOKADEM SABRINA** et leurs aides précieuses, pendant la réalisation de ce travail en particulier à **Mr ABD ALLAH** responsable de l'unité de fabrication du camembert, nous vous remercions d'avoir enrichie nos connaissances et de nous avoir guidés durant toute la période de stage et sans oublier **Mr MAGHARBI**.

Ensuite nous souhaitons remercier vivement tous le personnel de la laiterie pour leur aide et leur patience.

Nous tenons à remercier également tous ceux qui ont contribué de Près ou de loin à la réalisation de ce travail.



🌸 Merci 🌸



# Table des matières

Titre	Page
<b>Dédicace</b>	
<b>Remerciements</b>	
<b>Table des matières</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Table des figures</b>	
<b>Abréviations</b>	
<b>Résumé</b>	
Introduction générale	1
Chapitre 1 – synthèse bibliographique :	
1. Généralité sur le lait et le fromage	3
1.1. Le lait	3
1.1.1. Présentation et définition	3
1.1.2. Définition du lait	3
1.1.3. Différents types du lait	3
1.1.3.1. Lait traité thermiquement	4
1.1.3.2. Lait pasteurisé	4
1.1.3.3. Lait stérilisé	4
1.1.3.3.2. Lait U.H.T. (Ultra haute température)	5
1.1.3.4. Le lait en poudre	5
1.2. Composition et propriété physico-chimique du lait de vache	6
1.2.1. Propriété physiques du lait	6
1.2.1.1. pH	6
1.2.1.2. Acidité	6
1.2.1.3. Densité	6
1.2.2. Propriété et composition chimiques du lait	6
1.2.2.1.1. Eau	6
1.2.2.1.2. Glucides	7
1.2.2.1.3. Matière grasse	7
1.2.2.1.4. Matière azotée	7
1.2.2.1.5. Matière minérale	7
1.2.2.1.6. Enzymes	8
1.2.2.1.7. Vitamines	8
1.3. La Microbiologie et la diversité microbienne du lait cru	8
1.3.1. Flore indigène ou originelle	9
1.3.2. Flore de contamination	9
1.4. Caractéristiques et qualité microbiologiques du lait de vache	10
1.4.1. Contrôle microbiologique du lait cru	10
1.4.1.1. Flore mésophile aérobie totale(FMAT)	10
1.4.1.2. Flores de contamination et d'altérations	11
1.4.1.2.1. Bactéries de type coliforme	11
1.4.1.2.2. Levures et moisissures	11
1.4.1.3. Les flores pathogènes	11
1.4.2. Les microorganismes d'intérêt dans le lait	11
1.4.2.1. Les bactéries lactiques	11
1.4.3. Caractéristiques du lait	12
1.4.3.1. Caractéristiques organoleptiques	12
1.4.3.2. Caractéristiques physico-chimiques du lait	12

1.4.3.2.1. Masse volumique et densité de lait	12
1.4.3.2.2. Acidité de titration ou acidité Dornic	12
1.4.3.2.3. Le pH	12
1.4.3.2.4. Point de congélation	13
1.4.3.2.5. Point d'ébullition	13
1.5. Lait de vache : matière première dans la fabrication des fromagères	13
1.6. Le fromager	14
1.6.1. Définition	14
1.6.2. Les différents types de fromage	14
1.6.2.1. Le fromage frais ou fromage à pâte fraîche	14
1.6.2.2. Le fromage à pâte pressé	15
1.6.2.3. Les fromages à pâte molle	15
2 Caractéristiques principales du fromager type Camembert	15
2.1. Composition et valeur nutritionnelle	15
2.2. Etapes de fabrication du fromage type camembert	16
2.2.1. Préparation du lait	16
2.2.1.1. Standardisation	16
2.2.1.1.2. Homogénéisation	17
2.2.1.1.3. Pasteurisation	17
2.2.1.1.4. Maturation du lait	17
2.2.1.2. La coagulation	17
2.2.1.2.1. Coagulation acide	17
2.2.1.2.2. Coagulation par voie enzymatique (présure)	17
2.2.1.2.3. Coagulation mixte	18
2.2.1.3. Egouttage	18
2.2.1.4. Moulage	18
2.2.1.5. Salage	18
2.2.1.6. L'affinage	19
2.3 Facteurs qui influencent l'affinage	21
2.3.1. Le pH	21
2.3.2. L'activité de l'eau	21
2.3.3. Le sel	21
2.3.4. La température	21
2.4. Microflore utile dans la fabrication fromagère de type camembert	22
2.4.1. Bactéries	22
2.4.1.1. Bactéries lactiques (BL)	22
2.4.1.1.1 Rôle technologiques des bactéries lactiques	22
2.4.1.1.2 Rôle probiotique des bactéries lactiques	23
2.4.1.1.3. Présentation des principaux groupes	24
2.4.1.1.3.1. Les lactocoques	24
2.4.1.1.3.2. Les streptocoques	25
2.4.1.1.3.3. Les lactobacilles	26
2.4.1.1.4. La flore secondaire NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria)	28
2.4.2. Les bactéries d'affinage ou de surface	28
2.4.3. Les Levures	28
2.4.4. Les Moisissures	28
2.5. Les Ingrédients utilisées	29
2.5.1. Présure	29
2.5.2. Levains lactiques	29

2. Les levains les thermophiles	29
2.5.3. Les levains fongiques	29
2.5.3.1. Geotrichum candidum	30
2.5.3.2. Penicillium camemberti	30
2.5.4. Sels	30
3. Taxonomie et présentation des microorganismes d'affinage	31
3.1. Les levures	31
3.1.1. Caractérisation et définition	31
3.1.2. Taxonomie et présentation des levures	32
3.1.2.1. Le genre Geotrichum	32
3.1.2.1.1. Les caractéristiques	32
3.1.2.1.2. Classification	32
3.1.2.2. Le genre Kluyveromyces	33
3.1.2.2.1. Caractéristiques	33
3.1.2.2.2. Classification	33
3.1.3. Méthodes d'identification morphologique et physiologique des levures	34
3.1.3.1. Les caractéristiques phénotypiques	34
3.1.3.2. Les caractéristiques physiologiques	34
3.1.4. Conditions de croissance des levures	34
3.1.4.1. Sources nutritionnelles	34
3.1.4.1.1. Sources de carbone	35
3.1.4.1.2. Source d'azote	35
3.1.4.1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance	35
3.1.4.2. Les Facteurs physicochimique	35
3.1.4.2.1. La température de croissance	35
3.1.4.2.2. Le pH ou l'acidité	36
3.1.4.2.3. L'oxygène	36
3.1.4.2.4. La pression osmotique et l'activité d'eau	36
3.1.5. Rôle des levures d'affinage dans les fromages de type camembert	36
3.1.5.1. La croissance des levures à la surface des fromages	36
3.1.5.2. L'utilisation du lactose et du lactate	36
3.1.5.3. L'utilisation des lipides	37
3.1.5.4. L'utilisation des protéines et des peptides	37
3.2. Taxonomie et présentation des moisissures	37
3.2.1. Généralité et définition	37
3.2.2. Taxonomie des moisissures	38
3.2.2.1. Penicillium camemberti	38
3.2.2.1.1. Caractéristiques	38
3.2.2.1.2. Classification	38
3.2.3. Conditions de croissance des moisissures	39
3.2.3.1. Sources nutritionnelles	39
3.2.3.1.1. Source de carbone et d'énergie	39
3.2.3.1.2. Source d'azote	39
3.2.3.1.3. Eléments minéraux	40
3.2.3.2. Facteurs physicochimique	40
3.2.3.2.1. La Température de croissance	40
3.2.3.2.2. Le pH ou l'acidité	40
3.2.3.2.3. L'activité de l'eau ou l'humidité	40
3.2.4. Méthodes d'études des moisissures	41
3.2.4.1. Méthodes phénotypiques	41
3.2.4.1.1. Méthodes d'identification des moisissures	41

3.2.4.1.1.1. Aspect macroscopique	41
3.2.4.1.1.2. Analyse microscopique	41
3.2.4.1.3. Analyse moléculaire	42
3.2.5. L'intérêt technologique de P. camemberti dans les fromages de type Camembert	42
3.2.5.2. L'utilisation du lactose et du lactate	42
3.2.5.3. L'utilisation des lipides	43
3.2.5.4. L'utilisation des protéines	43
4. Les différents types d'interaction	43
4.1. Interactions directes	44
4.1.1. Prédation et parasitisme	44
4.1.2. Inhibition par contact direct entre les cellules	44
4.2. Interactions indirectes	44
4.2.1. Mutualisme	44
4.2.2. Neutralisme	45
4.2.3. Commensalisme	45
4.2.4. Compétition	45
<b>Chapitre 2 – Matériel et méthodes</b>	<b>46</b>
1. Description de l'entreprise (GIPLAIT) organigramme	46
1.1. La sous-direction de la qualité	48
1.1.1. L'organisation du service de Contrôle de Qualité	48
2.1. Méthodes de prélèvement et échantillonnage	50
2.1.1. Lieu d'étude et de prélèvement	50
2.1.2. Echantillonnage	50
3. Méthodes d'analyse microbiologiques utilisées pour le contrôle du fromage à pâte môle	51
3.1. Méthodes d'analyse des levures et des moisissures	51
3.1.1. Méthodes d'isolement	51
3.1.1.1. Préparation de la solution mère et des dilutions du fromage	51
3.1.1.2. Dénombrement des levures et moisissures	51
3.1.2. Méthodes macroscopiques et microscopiques des levures et moisissures	53
3.1.2.1. Méthodes macroscopique	53
3.1.2.2. Méthodes microscopiques	53
3.1.3. Méthodes biochimiques et micro-méthodes	54
3.1.3.1. La méthode API Candida (Système API pour les levures)	54
3.1.3.1.1. Principe du système Api Candidat	54
3.1.3.1.2. Présentations de la galerie API Candida pour les levures	54
3.1.4. Méthodes biochimiques et micro-méthodes (API système pour les moisissures)	55
3.1.5. La galerie API 20 C AUX (ce test pour les moisissures)	55
3.1.5.1. Principe	55
3.1.5.2. Identification des moisissures en 24-48 h	56
<b>Conclusion</b>	<b>57</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>58</b>

## Liste des tableaux

<b>N° du tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Composition du lait de vache	<b>08</b>
<b>Tableau 2</b>	Flore indigène du lait cru	<b>09</b>
<b>Tableau 3</b>	Flore microbienne du lait	<b>10</b>
<b>Tableau 4</b>	Caractéristiques physico-chimiques du lait	<b>13</b>
<b>Tableau 5</b>	Composition moyenne de fromage à pâte molle type Camembert	<b>16</b>
<b>Tableau 6</b>	Principaux groupes microbiens intervenant Au cours de l'affinage du Camembert	<b>30</b>

## Table des figures

N° de figure	Titre	page
Figure 1	Les Étapes de fabrication du fromage à pâte môle type camembert	20
Figure 2	Observation microscopique des lactocoques	24
Figure 3	<i>lactococcus lactis</i> (coloration de gram)	25
Figure 4	Les streptocoques (observation microscopique)	25
Figure 5	<i>St thermophilus</i> (coloration de gram)	26
Figure 6	Les lactobacilles (observation microscopique)	27
Figure 7	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> (coloration de gram (positif))	27
Figure 8	Morphologie de la levure : A : <i>Geotrichum</i> ; B : <i>Geotrichum candidum</i>	33
Figure 9	<i>Kluyveromyces lactis</i> (observation microscopique)	34
Figure 10	<i>Penicillium camembertii</i> (observation microscopique)	39
Figure 11	L'organigramme générale de la filiale (source : Giplait-SBA)	47
Figure 12	Organisation du service du contrôle de la qualité	48
Figure 13	laiteries TESSALA de Sidi bel abbés (lieu de prélèvement)	50
Figure 14	Prélèvement du fromage à pâte molle type camembert	50
Figure 15	Méthode de dénombrement décimale	52
Figure 16	Les Etapes de preparation de la dilution mere et dénombrement	52
Figure 17	La galerie API Candida pour les levures	54
Figure 18	La galerie API 20 C AUX pour les moisissures	56

# Liste des abréviations

**C°** : degré Celsius

**D°** : degré Dornic

**%** : pourcentage

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AP** : aspartylprotéase

**API** : Appareils et Procédés d'Identification

**AFLP** Amplified Fragment Length Polymorphism

**aw** : activité water (activité de l'eau)

**BL** : bactérie lactique

**Ca** : calcium

**CaCl<sub>2</sub>**: chlorure de calcium

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**Cm** : centimètre

**D. hansenii** : Debaryomyces hansenii

**Es** : extrait sec

**FMAT** : Flore mésophile aérobie totale

**GIPLAIT** : Groupe industriel de production laitière

**G . candidum** : Geotrichum candidum,

**gr** : gramme

**h** : heure

**J** : jour

**Kg** : kilogramme

**KJ** : kilojoule

**K. lactis** : Kluyveromyces lactis

**K. marxianus** : Kluyveromyces marxianus

**L.lactis** : **Lactococcus lactis**

**L. bulgaricus** : *Lactobacillus bulgaricus*

**MG** : matière grasse

**Mg** : magnésium

**mg** : milligramme

**ml** : millilitre

**mn** : minute

**MPa** : méga pascal

**MP** : métalloprotéase

**NaCl** : chlorure de sodium

**NSLAB** : *Non Starter Lactic Acid Bacteria*

**O<sub>2</sub>** : oxygène

**P.camemberti** : penicillium camemberti

P. roqueforti : penicillium camemberti

**Ph** : potentiel d'hydrogène

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA

**RFLPs** : Restriction Fragment Length Polymorphisms

**St thermophilus** : Streptococcus thermophilus

**T°** : température

**UFC** : unité formant colonie

**U.H.T** : Ultra haute température

**µm** : micro-mètre

## **Résumé**

La fabrication des fromages industriels implique l'utilisation d'un microbiote diversifié composé d'une population microbienne endogène naturelle apportée par le lait et l'autre exogène par un ensemencement complémentaire de ferments sélectionnés suivant la technologie utilisée par le fromager. Notre travail a porté sur l'étude de l'évolution de la charge microbienne au cours de l'affinage d'un fromage à pâte molle type camembert fabriqué à partir d'un lait cru. Les analyses microbiologiques tracées pour la réalisation de l'objectif de notre sujet porte sur l'analyse et le suivi trois lots de fabrication du fromage à pâte môle fabriqué au niveau de l'unité de transformation des laits et produits laitiers ' la laiterie TESSALA de Sidi Bel Abbès'. Les tests microbiologiques envisagés portent sur la recherche et dénombrement, et l'identification par des méthodes phénotypiques des levures et moisissures impliqués dans l'affinage du fromage à pâte môle 'camembert' qui ont été fait sur un milieu Sabouraud. Le suivi de la croissance et de l'activité de la microflore fongique de surface des fromages de type camembert au cours de l'affinage. Vu la crise sanitaire qui a touché notre pays par l'apparition du COVID-19 l'ensemble des travaux au niveau de laboratoire ont été suspendus.

**Mots clés** : microbiote, fromage à pâte molle, lait cru, l'affinage, camembert, les levure et moisissures

## **Abstract :**

The manufacture of industrial cheeses involves the use of a diversified microbiota composed of a natural endogenous microbial population provided by milk and the other exogenous by additional inoculation of ferments selected according to the technology used by the cheese. our work focused on the study of the evolution of the microbial load during the ripening of a soft cheese of the Camembert type made from raw milk microbiological analyzes traced for the achievement of our subject's objective covers the analysis and monitoring of three production batches of mole cheese manufactured at the milk and dairy product processing unit « The dairy TESSALA in Sidi Bel Abbas» the microbiological tests envisaged relate to the search for enumeration and identification by phenotype methods of yeasts and molds involved in the refining of mole camembert cheese which was made on a Sabouraud medium .monitoring the growth and activity of the fungal microflora on the surface of camembert-type cheeses during ripening given the health crisis that has affected our country by the appearance of Covid 19 all work at the laboratory level has been suspended.

**Keywords:** microbiota, soft cheese, raw milk, ripening, camembert, yeasts and molds

## ملخص

يتضمن تصنيع الجبن الصناعي استخدام مجموعة ميكروبيوتا متنوعة تتكون من مجموعة ميكروبيولوجية داخلية طبيعية يوفرها الحليب وأخرى خارجية عن طريق تلقیح تكميلي من الخميرة المختارة وفقاً للتقنية المستخدمة من قبل صانع الجبن. ركز عملنا على دراسة تطور الحمل الميكروبي أثناء إنضاج نوع جبن طري من نوع الكامبير المصنوع من الحليب الخام. التحليلات الميكروبيولوجية التي تم تتبعها لتحقيق هدف موضوعنا تتعلق بتحليل ومتابعة ثلاث دفعات إنتاجية من الجبن الخلد المنتج على مستوى وحدة تصنيع الحليب ومنتجات الألبان 'منتجات الألبان تسالا من سيدي بلعباس. الاختبارات الميكروبيولوجية المتصورة تتعلق بالبحث والتعداد، والتعرف بالطرق المظهرية للخمائر والقوالب المشاركة في تكرير جبن الخلد "كامبيرت" الذي تم تصنيعه على وسط سابورو. مراقبة نمو ونشاط الميكروفلورا السطحية الفطرية لجبن كامبيرت أثناء النضج. نظراً للأزمة COVID-19 الصحية التي أثرت على بلدنا بظهور، فقد تم تعليق جميع الأعمال على مستوى المختبر

الكلمات المفتاحية: الجراثيم، الجبن الطري، اللبن الخام، النضج، الكامبير، الخمائر، العفن

# **INTRODUCTION**

# Introduction générale

---

## Introduction générale

Le lait et les fromages constituent des sources de protéines. Les taux élevés en lactose, lipides et en protéines en font de lui un aliment nutritif, riche en énergie (**Walther et al., 2008**). La technologie fromagère vise à transformer le lait à d'autres produits de transformation comme le fromage. Le fromage fut à son origine, un mode de conservation du lait ou du moins des éléments susceptibles d'être conservés (**Eck et Gillis, 2006**). En Algérie le lait et ses dérivés constituent une denrée de grande consommation. Ils sont consommés sous forme de lait cru ou de lait recombinaison, lait fermenté ou transformé comme le yaourt, le lait fermenté (dite el lben) ou le fromage.

Le fromage est un milieu avec une microflore complexe de mélange des bactéries, des levures et des moisissures. Les bactéries lactiques constituent la flore la plus dominante dans ce produit et qui interviennent dans la transformation du lait en produit fromagère, en participant à l'acidification et à la coagulation du lait. Il existe différents types de fromages présentent des caractères spécifiques liés à la fois au mode de coagulation et d'égouttage et à la flore microbienne, qui libère des enzymes responsables de la saveur, de la texture et de l'aspect de la pâte. La fabrication du fromage à pâte molle type camembert exige l'emploi d'un lait de haute qualité bactériologique et physico-chimique.

Le fromage à pâte môle type camembert est considéré comme un écosystème complexe, il comporte des microorganismes qui sont essentiels pour production de ce type de fromage comme les bactéries lactiques, les bactéries de surface ou affinage, les levures et les moisissures. Ils participent soit de manière directe avec leur activité métabolique, soit de manière indirecte avec la libération d'enzymes (**Benloucif et Oulmi, 2017**)

Notre projet de fin d'étude a pour but d'étudier la microflore utile du fromage à pâte môle type camembert fabriqué localement au niveau de l'unité de transformation des produits laitiers dénommée "TASSALA de Sidi-Bel Abbès".

Les points tracés pour la réalisation de l'objectif de l'étude portent sur :

- Dénombrement et isolement des souches utiles à partir des échantillons du fromage à pâte molle type camembert durant l'affinage.
- Mettre en évidence l'évolution et la dynamique des souches d'intérêt au cours de l'affinage du fromage.
- Identification et caractérisation des souches isolées par l'application des méthodes phénotypiques.

Le manuscrit est structuré en comme suit :

## Introduction générale

---

Le premier chapitre porte sur, le lait comme matière première utilisé pour la fabrication du fromage ; leur composition en matière physico-chimique et microbiologique et leur caractéristiques organoleptiques. Aussi ; cette partie du mémoire nous avons présenté les différents type de fromage et en particulier le fromage à pâte môle ; le processus de fabrication, leur composition en matière physico-chimique et microbiologique et rôle des différents microorganisme dans la maturation et la finage du fromage à pâte môle. Par ailleurs, le deuxième chapitre résume la méthodologie prévue pour la réalisation de l'étude. Cette partie de mémoire, nous avons présenté sous forme d'une synthèse bibliographique les principales méthodes envisagées pour mettre en œuvre l'objectif tracé dans ce mémoire. Et enfin, une conclusion globale.

# **CHAPITRE I**

## **La synthèse bibliographique**

## 1. Généralité sur le lait et fromage

### 1.1. Le lait

#### 1.1.1. Présentation et définition

Le lait occupe une place importante dans l'alimentation humaine, c'est un aliment particulièrement nutritif, il peut à lui seul couvrir tous les besoins de l'organisme durant les premiers mois de la vie, il contient pratiquement tous les éléments nécessaires à la croissance de l'organisme humaine.

Le lait cru recueilli à la ferme par traite mécanique ou manuelle, soit directement transporté au centre de ramassage où il est réfrigéré, soit stocké dans des réservoirs réfrigérés avant le transport dans le cas d'exploitations importantes, dans ces conditions, la flore microbienne est stabilisée (**Guiraud, 2012**). Le lait doit provenir d'animaux sains, soumis à un contrôle vétérinaire, d'une préparation (traite, conditionnement, stockage) effectuée dans des conditions hygiéniques satisfaisantes.

#### 1.1.2. Définition du lait

Le lait est défini comme « le produit intégral de la traite et ininterrompu d'une femelle laitière portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et non contenir de colostrum ». Il doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires. Il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation des lipides et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation (**Romain et al., 2008**)

#### 1.1.3. Différents types du lait

L'évolution des processus technologiques, des techniques de conservation et de distribution a permis l'élaboration d'une large gamme de « laits de consommation » qui se distinguent par leur composition, leur qualité nutritionnelle, organoleptique et leur durée de conservation. Les laits destinés à la consommation humaine peuvent être classés en deux catégories (**Mahaut et al, 2000**),

**1.1.3.1. Laits traités thermiquement****Définition**

Les laits (traités) industriels peuvent consister en une modification de composition (lait écrémé...etc.) et en traitement thermique destiné à éliminer les éventuels germes pathogènes (**Guiraud, 2003**).

Le principe du traitement thermique du lait à très haute température a d'emblée retenu l'attention par les perspectives qu'il offrait en faveur de la qualité bactériologique et d'une plus facile commercialisation du lait de consommation en nature.

**1.1.3.2. Lait pasteurisé****Définition**

Le lait pasteurisé, fabriqué à partir de lait cru ou de lait reconstitué, écrémé ou non, est un lait qui a subi un traitement thermique (pasteurisation) qui détruit plus de 90% de la flore (jusqu'à 98%) contenue dans le lait (notamment tous les germes pathogènes non sporulés, tels que les germes de tuberculose et de la brucellose) (**Jean Christian, 2001**).

La pasteurisation du lait a pour but de détruire les microorganismes pathogènes, elle se fait soit par pasteurisation basse (62-65C°/30min), soit par pasteurisation haute (71-72C°/15-40 sec pour le lait cru de bonne qualité et une flache pasteurisation (85-90 C°/1-2 sec) pour les laits crus de mauvaise qualité.

**1.1.3.3. Lait stérilisé**

Selon le procédé de stérilisation, on distingue le lait stérilisé et le lait U.H.T définis en 1979. Ces laits doivent être stables jusqu'à la date limite de consommation.

**Définition :**

La dénomination « lait stérilisé » est réservée au lait préalablement conditionné dans un emballage hermétique, puis chauffé pendant 15 à 20 minutes à une température de 115-120°C afin de détruire tous les germes susceptibles de s'y développer, Le lait est ensuite rapidement refroidi.

Le lait stérilisé est obtenu après 20 minutes de chauffage à 120 °C dans un emballage étanche Conditionné dans un récipient hermétiquement clos, étanche au liquide et au micro-organisme pathogène Il peut se conserver très longtemps à température ambiante (**Guiraud, 2003**).

#### **1.1.3.3.1. Lait U.H.T. (Ultra haute température)**

##### **Définition :**

C'est un lait traité par la chaleur, qui doit détruire les enzymes, les microorganismes pathogènes, et conditionné ensuite aseptiquement dans un récipient stérile, hermétiquement clos, étanche aux liquides et aux micro-organismes. Le traitement thermique peut être soit direct (injection de vapeur d'eau), soit indirect. Il est réalisé à 135-150°C pendant 2.5 secondes (**Leseur et Melik, 1999**).

Le lait UHT est un lait de longue conservation, stérilisé par upérisation à haute température. Le lait UHT, à un bon goût et n'est guère modifié, il peut se conserver plusieurs mois à une température ambiante.

#### **1.1.3.4. Le lait en poudre**

##### **Définition :**

Le lait en poudre est un produit solide obtenu par élimination de l'eau du lait, du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini. On distingue les laits en poudre suivants:

- Le lait en poudre riche en matières grasses ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre entier ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26 % et moins de 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre partiellement écrémé ou poudre de lait partiellement écrémé : lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.
- Le lait en poudre écrémé ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses.

La poudre du lait est produite par l'évaporation de l'eau du lait, cette déshydratation assure sa longue conservation dans les emballages fermés à l'abri de l'air et l'humidité (**Lafitedupont, 2011**).

## 1.2. Composition et propriété physico-chimique du lait de vache

### 1.2.1. Propriété physiques du lait

La composition du lait est très complexe, de point de vue physique, le lait présente une hétérogénéité, puisque certains composants sont dominants quantitativement, comme l'eau, la matière grasse, les protéines et le lactose ; et des composés mineurs qui sont les matières minérales, les enzymes et les vitamines. Les propriétés physiques comme la densité absolue, la viscosité, la tension superficielle et la chaleur spécifique dépendent de l'ensemble des constituants (**Mathieu, 1998**).

#### 1.2.1.1. PH

Le pH du lait de vache fraîchement trait est légèrement acide, un faible changement du pH du côté acide a des effets importants sur l'équilibre des minéraux et sur la stabilité de la suspension colloïdale de caséine (**Alais et Linden, 1997**).

#### 1.2.1.2. Acidité

Les protéines, surtout les caséines et la lactalbumine, de substances minérales telles que les phosphates, CO<sub>2</sub> et l'acide citrique sont les éléments responsables de l'acidité naturelle (**Amiot et al, 2002**), l'acidité est exprimée en degrés DORNI D° c'est à dire en décigrammes d'acide lactique par litre. Sous l'effet des bactéries lactiques, le taux d'acide lactique augmente et donne une nouvelle acidité nommée acidité développée.

#### 1.2.1.3. Densité

La densité du lait est liée à sa richesse en matière sèche, Elle dépend aussi de leur degré d'hydratation, notamment les protéines. À 15 °C, la densité du lait de mélange se situe entre 1.030 et 1.035 avec une moyenne de 1.032. Plus un lait contient un pourcentage élevé en matière grasse, plus sa densité sera basse (**Amiot et al. 2002**)

### 1.2.2. Propriété chimiques du lait

#### 1.2.2.1. Eau

C'est l'élément le plus important du point de vue pondéral (en quantité). Elle représente environ 81 à 87% du volume du lait selon la race, il se trouve sous deux formes : l'eau libre (96% de la totalité) et liée à la matière sèche (4% de la totalité) (**Ramet, 1985**). Elle provient du sang par filtration.

### 1.2.2.2. Glucides

Le lait contient des glucides essentiellement représentés par le lactose, son constituant le plus abondant après l'eau, sa molécule  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , est constituée d'un résidu galactose uni à un résidu glucose, le lactose est synthétisé dans les cellules des acini à partir du glucose sanguin, celui-ci est en grande partie produit par le foie (**Mathieu, 1999**). Le lactose est le composant majeur le plus simple et le plus constant en proportion, c'est le constituant du lait le plus rapidement dégradé par l'action microbienne, en effet la microflore lactique transforme le lactose en acide lactique, cette transformation est souvent utile et parfois gênante de varier peu (48 à 50g/l). (**Gourseaud, 2000**)

### 1.2.2.3. Matière grasse

Les matières grasses sont les éléments majeurs du lait (30 à 60 g/l), dont la quantité varie en fonction des conditions d'élevage ; elles se trouvent en émulsion sous forme de globules gras individualisés (0.1 à 20  $\mu$ m de dimension) (**Vignola, 2002**). Les lipides du lait sont constitués de 98% de triglycérides, 1% de phospholipides, 1% de stérols (cholestérol), tocophérol et de vitamines liposolubles

### 1.2.2.4. Matière azotée

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait. Les protéines se répartissent en deux phases : une phase micellaire (insoluble) et une phase protéique (soluble). La phase micellaire représente la caséine totale (environ 80% des protéines du lait).

Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (2,9% de Ca, 0,1% de Mg, 4,3% d'ions phosphate, 0,5% d'ions citrate). La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine (**Marchin, 2007**).

### 1.2.2.5. Matière minérale

La matière minérale du lait (7g à 7,5g/l) est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. Il est possible de doser les matières minérales ou cendres du lait par une méthode de calcination à 550°C. Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont existents dans les deux fractions (**Mathieu, 1998**). Il existe un équilibre entre les formes solubles et colloïdales, d'une part,

et entre les formes ionisées et non dissociées d'autre part. Cet état est précaire parce qu'il est sensible à divers facteurs, notamment au pH, à la température, et à la concentration ou à l'addition de calcium.

#### 1.2.2.6. Enzymes

Le lait contient principalement trois types d'enzymes : les hydrolases, les déshydrolases (ou oxydase) et les oxygénases. Ces enzymes originaux proviennent du pis de la vache, et les enzymes bactériens d'origine bactérien. Ils existent cependant beaucoup de bactéries qui produisent le même type d'enzymes (**Vignola, 2002**).

#### 1.2.2.7. Vitamines

Les vitamines sont des substances biologiques indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser. Le lait et ses dérivés sont des sources assez riches en vitamine A, B12 et B2; un peu moins en vitamine B1 et B6. Par contre, ils ne contiennent que peu de vitamines E, et acide folique (vitamine C) (**Romain et al ,2008**). (**Tableau 1**)

**Tableau 1** : Composition du lait de vache (**Alais, 1975**).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 – 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Glucides	3,6 – 5,5	4,6
Minéraux	0,7 – 0,9	0,8

### 1.3. La Microbiologie et la diversité microbienne du lait cru

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de  $10^3$  germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (**Cuq, 2007**). Les flores microbiennes présentes dans le lait et les produits laitiers sont très complexes. Ces microflore créent entre elles des phénomènes d'antagonisme.

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz, des substances aromatiques, de l'acide lactique, diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (**Anonyme, 2009**).

L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages, mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (**Robinson, 2002**).

### 1.3.1. Flore indigène ou originelle

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (**Vignola, 2002**).

Ces microorganismes sont en relation étroite avec l'alimentation et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait. Les genres dominants en sont principalement des microorganismes mésophiles (*Micrococcus sp*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ou *Lactococcus* et les bactéries à Gram négatif).(**Mallet et al.,2012**).(**Tableau02**)

**Tableau 02.** Flore indigène du lait cru (**Vignola, 2002**)

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus/lactococcus</i>	< 10
Bactérie Gram négative	< 10

### 1.3.2. Flore de contamination

La flore de contamination est l'ensemble des microorganismes du lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**). Ces contaminations par divers

microorganismes peuvent provenir de l'environnement *entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *microcoques*, *corynébactéries*, *Bacillus*, etc.

Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes et éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (Leyral et Vierling, 2007). (Tableau 03)

Tableau 03 .Flore microbienne du lait (Leyral et Vierling, 2007).

Flore originelle		Flore de contamination	
Bactéries des Canaux galactophores	Bactéries contaminant le lait pendant et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présentes sur l'animal malade
<i>Lactobacilles</i> , <i>Streptocoques lactiques</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobactérium</i> <i>Entérobactéries</i> , <i>Microcoques</i> <i>Corynébactéries</i> , <i>Bacillus</i> <i>Streptocoques faecalis</i> et <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> Coliformes fécaux <i>Salmonella</i> <i>Yersinia</i> et <i>Campylobacter</i>	<i>S.aureus</i> <i>Brucella</i> et <i>Listeria</i>

#### 1.4. Caractéristiques et qualité microbiologiques du lait de vache

##### 1.4.1. Contrôle microbiologique du lait cru

L'appréciation de la qualité microbiologique du lait cru consiste en la recherche des germes pathogènes, des germes utiles et des germes nuisible à la conservation. Ces micro-organismes peuvent proliférer dans le lait qui constitue milieu de culture favorable.

###### 1.4.1.1. Flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore mésophile aérobie totale est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination. Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du lait cru et permet de suivre son évolution au cours de sa transformation. Le nombre de germes totaux pourra donner une indication de l'état sanitaire du lait (Guiraud et Rosec, 2004).

#### 1.4.1.2. Flores de contamination et d'altérations :

Seules quelques-unes des espèces présentes seront responsables de l'altération du produit. Elles sont d'abord sélectionnées en fonction des conditions physico-chimiques mises en jeu (nature de produit, pH, pression partielle en oxygène, température de stockage, etc) (**Bennefoy et al, 2002**).

##### 1.4.1.2.1. Bactéries de type coliforme :

Les coliformes sont des bactéries Gram (-) non sporulées, aérobies ou anaérobies facultatives. (**Billon et Sauve, 2009**).

##### 1.4.1.2.2. Levures et moisissures :

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires et sont souvent rondes à ovales, la division se fait par bourgeonnement, plus rarement par scissiparité. A cité que des levures d'altération sont associées au domaine laitier (**Hermier et al, 1992**). Ont cité que les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux, dix fois plus grosse que les levures, il existe plusieurs genres de moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (**Meyer et al .2004**).

##### 1.4.1.3. Les flores pathogènes

Les germes pathogènes aux quels on accorde une importance particulière, en raison de la gravité ou de la fréquence des risques qu'ils présentent sont cités ci-dessous : Les principales bactériennes infectieuses sont *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* et *Campylobacter sp*. Les principales bactéries toxigènes sont *Staphylococcus sp*, *Clostridium botulinum* (**Vignola, 2002**).

#### 1.4.2. Les microorganismes d'intérêt dans le lait

Dans le domain de l'industrie laitière, un grand nombre de microorganismes utiles sont impliqués, parmi eux les bactéries lactiques.

##### 1.4.2.1. Les bactéries lactiques :

Ce sont des bactéries Gram + (coques ou bacilles) produisant de l'acide lactique par fermentation des oses (fermentation lactique). On distingue principalement : les lactocoques, les leuconostocs, les pédiocoques, les *streptocoques thermophiles*, les lactobacilles mésophiles et thermophiles et les entérocoques. Elles ont pour rôle essentiels d'acidifier le lait et le caillé, de

participer à la formation du goût (protéolyse, production d'arômes), de la texture et de l'ouverture des produits laitiers. Ces bactéries sont maintenant largement utilisées sous formes de levains sélectionnés.

### 1.4.3. Caractéristiques du lait

#### 1.4.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Le lait est un liquide biologique comestible deux fois plus visqueux que l'eau, opaque, blanc, d'une saveur douceâtre, d'odeur peu accentuée (**Kabir, 2015**).

#### 1.4.3.2. Caractéristiques physico-chimiques de lait

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique et la densité, acidité de titration ou acidité Dornic, le pH, le point de congélation et le point d'ébullition. (**Tableau 4**)

##### 1.4.3.2.1. Masse volumique et densité de lait

La masse volumique est le plus souvent exprimée en gramme par millilitre ou en kilogramme par litre. La densité moyenne des laits mesurée à 20°C est entre 1,028 et 1,030. Cette propriété physique varie selon la teneur en matière sèche, en matière grasse, de l'augmentation de la température et des disponibilités alimentaires (**Charol et Vignola, 2002**).

##### 1.4.3.2.2. Acidité de titration ou acidité Dornic

L'acidité développée est due à l'acide lactique formé au cours de la fermentation lactique, elle est de 15 à 17° Dornic dans les conditions normales (1 degré Dornic (°D) correspond à 1 mg d'acide lactique dans 10 ml de lait. Elle permet de juger l'état de conservation de lait (**Benayache, 2016**).

##### 1.4.3.2.3. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action de bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium ( $H_3O^+$ ) et donc une diminution du pH.

#### 1.4.3.2.4. Point de congélation

Le point de congélation du lait est le seul paramètre fiable pour vérifier un mouillage. C'est la température de passage de l'état liquide à l'état solide. Le point de congélation du lait de vache, peut varier de - 0,52 à - 0,56°C, toute variation supérieure à - 0,52°C est un indice de mouillage.

#### 1.4.3.2.5. Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi, comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés, il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C. Cette propriété physique diminue avec la pression, on applique ce principe dans le procédé de concentration du lait (**Charol et Vignola ,2002**).

**Tableau 04** : caractéristiques physico-chimiques du lait (**Djouadi, 2014**).

Caractéristique	Valeurs
pH (20c°)	6.5 à 6.7
Densité (g /ml)	1.028 à 1.032
Acidité titrable (D°)	15 à 17
Point d'ébullition (°C)	100.5
Point de congélation (°C)	-0.51 à -0.55

### 1.5. Lait de vache : matière première dans la fabrication des fromagères

Le lait de vache a toujours été un aliment essentiel, il occupe une place stratégique dans notre alimentation et constitue une source importante équilibrée en nutriments de bases (**Fernane, 2017**). Pour fabriquer un produit fromager de niveau qualitatif acceptable les normes exigent l'utilisation du produit lait comme matière première de bonne qualité microbiologique.

## 1.6. le fromager

### 1.6.1. Définition

Selon la norme *Codex alimentaire*, le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance solide ou semi-solide (**Gillis, 2000**). Dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu par coagulation du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation. Sur le plan nutritionnel, le fromage est un aliment noble grâce à ses protéines de haute valeur biologique et à sa richesse minérale.

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

### 1.6.2. Les différents types de fromage

#### 1.6.2.1. Le fromage frais ou fromage à pâte fraîche

La dénomination « fromage blanc » est réservée à un fromage non affiné qui, lorsqu'il est fermenté, a subi une fermentation principalement lactique. Les « fromages blancs frais » ou « fromages frais » sont des fromages blancs fermentés qui répondent à un critère supplémentaire : ils doivent renfermer une flore vivante au moment de la vente au consommateur.

Fromages peu égouttés qui n'ont pas été affinés, il y'a juste coagulation des protéines du lait sous l'effet des ferments lactiques (acidification), dont le taux d'humidité est très élevé, de 60 à 80 % et une teneur en matière grasse réduite, de 0,5 à 30 (**Majdi ,2009**).La pâte fraîche est d'un blanc éclatant, d'une texture molle, granuleuse ou lisse, crémeuse et veloutée selon le fromage. Le caillé égoutté peut être aromatisé à l'ail, aux fines herbes, au poivre, à l'oignon haché, aux raisins secs, etc.

### 1.6.2.2. Le fromage à pâte pressé

Il s'agit des fromages dont le caillé est pressé après soutirage, puis mis à l'affinage. Ils sont constitués d'une pâte compacte, renfermant un peu moins d'eau que les fromages frais, mais contenant plus de sels minéraux dont les sels de calcium notamment. Dans cette catégorie, on distingue les fromages à pâte pressé non cuite et les fromages à pâte pressé cuite (Yıldız, 2010).

### 1.6.2.3. Les fromages à pâte molle

Les fromages à pâte molle sont définis dans la norme internationale *Codex Alimentaires* comme étant tous les fromages dont la teneur en eau après élimination des matières grasses est supérieure à 67 %.

Selon la conduite de l'affinage, deux types de croûte peuvent se développer sur les fromages à pâte molle permettant de diviser cette famille en deux sous familles : les pâtes molles à croûte fleurie (Brie, Camembert, Coulommiers) et les pâtes molles à croûte lavée (Epoisses, Limburger, Livarot, Maroilles, Munster, Tilsit).

## 2. Caractéristiques principales de l'écosystème fromager type Camembert

Le camembert est un fromage à pâte molle, affiné en surface, principalement par des moisissures blanches, conformément à la norme générale pour le fromage, qui se présente sous la forme d'un cylindre plat ou de morceaux du dit cylindre. La pâte a une couleur allant du blanc cassé au jaune pâle et une texture molle mais non friable, affinée de la surface au centre du fromage. Il a un diamètre de 10 à 11 cm et une épaisseur de 3 cm. Il renferme au moins 40 % de matière grasse et 110 g de matière sèche. C'est un fromage qui n'est pas prêt à la consommation immédiatement après la fabrication ; il doit être maintenu pendant un certain temps dans certaines conditions pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du camembert (Eck, 1987).

### 2.1. Composition et valeur nutritionnelle

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

La matière grasse du camembert (25 à 40%) et constitue une source importante de la flaveur conférée au produit fini (Neelakanten et al, 1971). Pour les autres nutriments, le camembert constitue un apport important en calcium (200 à 700 mg/ 100g), en phosphore, en sodium et en vitamines (notamment du groupe B) (Eck, 1990). (Tableau 05)

**Tableau 05.** Composition moyenne de fromage à pâte molle type Camembert (Guégen. 1979)

Constituants	Composition
Eau (g)	50
Energie (Kcal)	310
Glucides (g)	4
Lipides (g)	24
Protéine (g)	20
Calcium (mg)	400
Phosphore (mg)	250
Magnesium (mg)	20
Potassium (mg)	150
Sodium (mg)	700
Zinc (mg)	5
Vitamine A (U.I)	1010

## 2.2. Etapes de fabrication du camembert

La fabrication du camembert passe par les étapes suivantes : (Figure 1)

**2.2.1. Préparation du lait :** La préparation du lait en fromagerie consiste en :

### 2.2.1.1. Standardisation

Les sortes de fromage étant souvent classées en fonction du pourcentage de matière grasse sur extrait sec (MG/ES), la teneur en matière grasse du lait de fromagerie doit donc être ajustée en conséquence. C'est pour cette raison que la teneur en protéines et la teneur en matière grasse du lait doivent être déterminée tout au long de l'année et le rapport entre les deux doit être standardisé à la valeur requise

### 2.2.1.2. Homogénéisation

L'homogénéisation du lait est utilisée dans l'industrie laitière pour stabiliser l'émulsion de matière grasse du lait et éviter la séparation de la crème. Ce procédé consiste à faire éclater les globules de matière grasse en fines particules. Celles-ci ne remontent ainsi pas à la surface, mais se répartissent de façon homogène dans la phase aqueuse du lait, ce qui empêche la séparation de la crème même après un entreposage de plusieurs jours.

### 2.2.1.3. Pasteurisation

La pasteurisation est un chauffage suffisant pour détruire la plus part des microorganismes pathogènes. La température de pasteurisation la plus fréquente est comprise entre 65 et 75°C et parfois entre 80 et 85°C pendant 15 à 20 secondes (**Guiraud, 2003**).

### 2.2.1.4. Maturation du lait

Après la pasteurisation, le lait doit mûrir, cette maturation consiste à laisser séjourner le lait à une température et un temps donné, avec ou sans ensemencement du lait par des bactéries lactiques, Il existe diverses méthodes de maturation dont le choix est fonction de la qualité du lait reçu, de l'organisation du travail et de la nature du fromage (**Anonyme, 1995**).

## 2.2.2. La coagulation

La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines qui flocculent puis se soudent pour former un gel emprisonnent les éléments solubles du lait. En distingue trois types coagulation :

### 2.2.2.1. Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leurs points isoélectriques (pH=4,6) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui transforment le lactose (**Romain et al, 2008**).

### 2.2.2.2. Coagulation par voie enzymatique (présure)

Il y'a un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne, ayant la propriété de coaguler le lait. La présure d'origine animale est le coagulant le plus utilisé (**St-Gelais et al ,2002**). La dénomination « présure » est donné à l'extrait coagulant provenant de caillète (quatrième poche de l'estomac) de jeunes ruminants (en générale des veaux) abattus avant sevrage. Elle contient en réalité deux fractions actives, l'une majeur par la chymosine, l'autre mineure par la pepsine, dont la proportion varie selon l'âge de la bête.

### 2.2.2.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâtes molle et à pâte pressés (**Romain et al. 2008**).

### 2.2.3. Egouttage

Cette phase consiste en l'élimination plus au moins grande du lactosérum. Le rôle de l'égouttage ne se limite pas à amener le coagulum à une teneur définie en eau, il permet aussi de régler sa minéralisation et l'élimination de son lactose. Dans le cas du Camembert, des traitements mécaniques sont utilisées pour permettre l'élimination du lactosérum (**St Gelais et Tirard-Collet, 2002**).

### 2.2.4. Moulage

Le moulage est la répartition du caillé dans des moules perforés, en métal ou en matière plastique, dont la forme et les dimensions varient avec le type de fromage. Il consiste donc à donner au fromage sa forme recherchée (**Veisseyre, 1975**).

### 2.2.5. Salage

Le salage est réalisé par incorporation de sel soit par dépôt en surface ou dans la masse ou par immersion dans une saumure. Cette étape complète la phase précédente et agit directement sur le processus d'affinage (**Forquin ,2010**).

Brièvement, le salage joue un triple rôle dans la fabrication fromagère:

- Il complète l'égouttage et contribuera ainsi à la formation de la croûte.
- Il règle l'activité de l'eau et ainsi favorise ou freine le développement des microorganismes tout en régulant les activités enzymatique.
- Il révèle la saveur propre du fromage en influençant le goût et en renforçant les arômes.

### 2.2.6. L'affinage

L'affinage est la dernière étape de la transformation fromagère. Sa durée varie de quelques jours à quelques mois selon le type de fromage et ce, afin d'obtenir les qualités texturales et organoleptiques désirées.

L'affinage correspond à une succession de transformations biochimiques, réalisées à la fois par des enzymes déjà présentes dans le lait ou le caillé, et par des enzymes synthétisées par la microflore qui se développe au cours de la maturation (bactéries, levures et/ou moisissures) **Mahaut et al., 2000**). Dans le cas des pâtes molles type camembert, l'affinage se fait également de la surface vers l'intérieur, la période d'affinage du Camembert est généralement courte, soit entre 12 et 45 jours (jr) et se déroule à une température variant habituellement entre 12 et 14°C.

Les fromages sont généralement entreposés dans un lieu d'affinage permettant de contrôler l'humidité relative entre 85 et 95 %. Le pH à la fin d'affinage du Camembert atteint environ 7,4 en surface et 6,9 au centre. Les fromages de type camembert sont emballés sous film et boîte en bois ou en carton. Les propriétés des films d'emballage peuvent différer en termes de perméabilité aux gaz et à la vapeur d'eau et permettre ainsi de maîtriser l'évolution de l'affinage jusqu'au moment de la consommation.



1-collecte du lait de vache cru



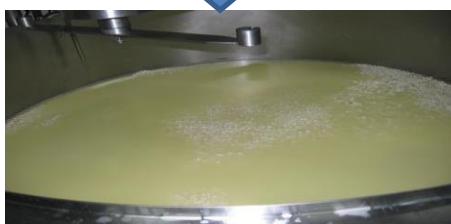
2-pasteurisation du lait



3-caillage de lait (coagulation mixte)



4-tranchage – découpage



5- égouttage du caillé et récupération du sérum



10-conditionnement



9- fromage affiné



8-affinage dans des hâloire



7- salage au bain de saumure



6-moulage manuel

Figure 01: Les Étapes de fabrication du fromage à pâte môle type camembert

### 2.3. Facteurs qui influencent l'affinage

Tous les facteurs susceptibles d'agir sur le développement microbien et les activités enzymatiques jouent un rôle déterminant sur la dynamique de l'affinage.

#### 2.3.1. Le pH

Pendant l'affinage, l'influence du pH sur les développements microbiens, l'activité des enzymes associées et la texture des fromages est déterminante. Parmi les micro-organismes intervenant dans l'affinage, seules les bactéries lactiques, les levures et les moisissures (**van den Tempel et Jakobsen, 2000**) peuvent se développer à des pH inférieurs à 5.

#### 2.3.2. L'activité de l'eau :

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) est un facteur important dans le développement microbien et dans l'expression de l'activité enzymatique, car un abaissement à un taux inférieur à 0,5 ralentit cette activité et ne permet pas la multiplication des micro-organismes (**Acker, 1996**). Par contre, constatent que cet abaissement de l' $a_w$  contribue à l'augmentation de la fermeté du fromage.

#### 2.3.3. Le sel

L'effet de la teneur sélective du sel sur le développement des moisissures en surface des pâtes molles est bien connu. Un salage assez prononcé limite ou même empêche la croissance de *Geotrichum candidum* sans affecter notablement celle de *Penicillium* (**Gueguen et al, 1974**). Le salage diminue aussi l'activité des enzymes (lipases et protéases notamment) dans le fromage type Camembert.

#### 2.3.4. La température T°

C'est un facteur régulateur important de la croissance microbienne et de l'activité enzymatique. Néanmoins, chaque type de réaction particulière nécessite une gamme de température optimale. En effet, les moisissures se développent favorablement à 20-25°C, les bactéries lactiques mésophiles à 30-35°C. L'optimum d'activité pour les lipases se situe entre 30 et 35°C alors qu'il est plus élevé dans le cas des protéases (40-45°C), (**Mietton et al 1994**).

## 2.4. Microflore utile dans la fabrication fromagère de type camembert

Dans le domaine de la fabrication fromagère de type camembert, de multiples microorganismes utiles sont impliqués comme les bactéries, les moisissures, les levures d'origine naturels et /ou additionnel, ces micro-organismes sont introduits dans le lait au début de la fabrication sous forme des « ferments », ils sont sous forme lyophilisée, congelée ou liquide et on peut les utiliser soit en pulvérisation, soit versé directement dans le lait avec emprésurage, qui jouent un rôle majeur dans le développement des qualités sanitaires et sensorielles du produit fini.(Tableau 06)

### 2.4.1. Bactéries

Les bactéries nécessaires à la fabrication des fromages de type Camembert se regroupent en deux principales catégories : les bactéries lactiques et les bactéries d'affinage.

#### 2.4.1.1. Bactéries lactiques (BL)

Dans le processus de transformation du lait en fromage à coagulation lactique ou mixte, la microflore lactique est la première flore à intervenir. Les bactéries lactiques sont classées en différents genres, selon la composition de leur paroi cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et génétiques (Stiles et Holzappel, 1997).

Elles sont des cellules procaryotes organotrophes formant une famille de bactéries, de morphologie et de physiologie assez hétérogènes (coque ou bacille, mésophile ou thermophile, homo-fermentaires ou hétéro-fermentaires...).Ce sont des bactéries à Gram positif ,catalase-négatives, asporulées, aéroanaérobie facultatives ou micro-aérophiles c'est-à-dire qui se développent dans un milieu faiblement oxygéné, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme (Pringsulaka et al, 2011).

##### 2.4.1.1.1 Rôle technologiques des bactéries lactiques

Les BL utilisées comme ferment dans la fabrication fromagère ont pour rôles essentiels :

- D'acidifier le lait et le caillé, cette activité est possible d'abord grâce à la présence de l'enzyme $\beta$ -galactosidase, qui permet de scinder le lactose en glucose et en galactose, Cette acidification se caractérise aussi par des odeurs et des saveurs sûres.

- De réaliser une fermentation lactique, c'est-à-dire une réaction de transformation du lactose, sucre majoritairement contenu dans le lait en acide lactique.
- D'abaisser le pH par la production d'acide lactique aux dépens du lactose du lait, ce qui favorise la microflore acidophile comme les levures et les moisissures.
- D'augmenter la synérèse du caillé.
- De participer à la formation du goût (protéolyse, production de composés aromatiques et de précurseur d'arômes) et participer à la texture (gélification du produit, modification des conditions physicochimiques de la matière première, enzymes de coagulation, exopolysaccharides...), donc améliorer la qualité organoleptique des fromages.
- D'augmenter la durée de conservation des fromages.
- D'inhiber la croissance des bactéries nuisibles.

#### 2.4.1.1.2. Rôle probiotique des bactéries lactiques

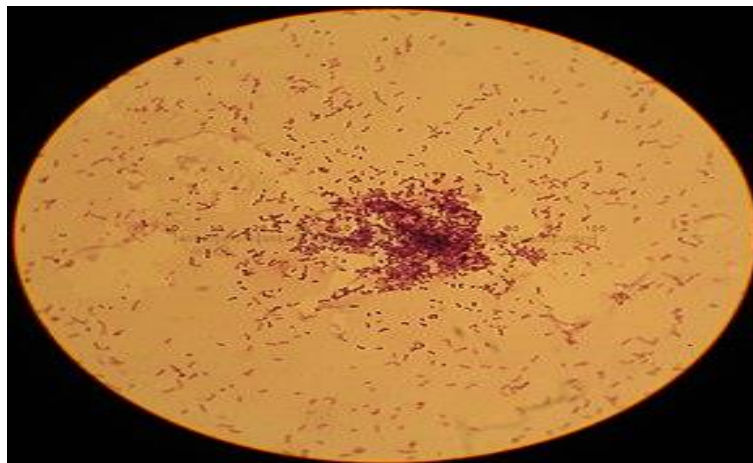
Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivant qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriés ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO, 2001) ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes. De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*). *Lb. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt. . (Makhloufi., 2012).

- Ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque.
- La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité
- Les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes Natural killer, premières défense contre un agent exogène.
- Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses. (Makhloufi., 2012).

### 2.4.1.1.3. Présentation des principaux groupes

#### 2.4.1.1.3.1. Les lactocoques

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique, *seul Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002). (Figure 2)

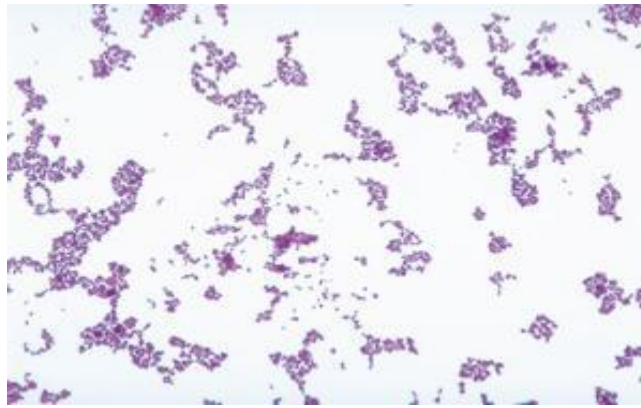


**Figure 02** : observation microscopique des lactocoques

#### ***Lactococcus lactis* : rôle dans le fromage**

*L.lactis* est une bactérie à Gram positif, non mobile, non sporulante, mesurant en moyenne de 0,5 par 1,5 micromètre, est une lactique homofermentaire, son métabolisme est hétérotrophe, anaérobie aérotolestante. Sa température optimale de croissance se situe aux environs de 30 °C (elle est dite mésophile), (Figure 03).

Leur fonction principale est d'acidifier le lait, créant ainsi un milieu défavorable au développement des germes indésirables. Ces levains mésophiles sont en général employés pour la fabrication des fromages dont la température du caillé ne dépasse pas 40 °C soit principalement les fromages à pâte molle.



**Figure 03:** *Lactococcus lactis* (coloration de gram)

#### 2.4.1.1.3.2. Les streptocoques

Les Streptocoques sont des coques Gram positif, disposés en paires ou en chaînettes, non sporulés, apparaissant parfois capsulés, immobiles, anaérobies facultatifs, fragiles aux variations de température et de PH. Leur pouvoir pathogène est très polymorphe selon les espèces (Ctinils, 2010). Le genre *Streptococcus* contient plus de 40 espèces. Elles se répartissent en six groupes, chaque groupe est caractérisé par distinct potentiel pathogénique et autres propriétés (Figure 04)



**Figure 04 :** Les streptocoques (observation microscopique)

#### ***Streptococcus thermophilus* : Rôle dans le fromage**

*St thermophilus* est un ferment thermophile utilisé surtout pour les fromages à pâte pressée cuite, dans les fromages Camembert, l'ajout de ferments thermophiles a donné naissance aux fromages dits stabilisés, en opposition aux caillés traditionnels qui n'en contiennent pas. L'intérêt pour les pâtes stabilisées vient du fait qu'elles s'affaissent moins une fois coupées, ce qui est recherché par certains consommateurs. Dans ces fromages stabilisés, l'acidification de la pâte est ralentie, et le pH atteint des valeurs autour de 5,2. Dans ces conditions, le calcium est davantage

retenu dans la matrice fromagère, ce qui favorise l'apparition d'une texture plus élastique, et donc moins coulante (Lawrence RC, Creamer LK et Gilles J, 1987). *St thermophilus* disparaît rapidement durant l'affinage. On suppose que cette disparition résulte de la lyse des cellules bactériennes.(Figure 05)

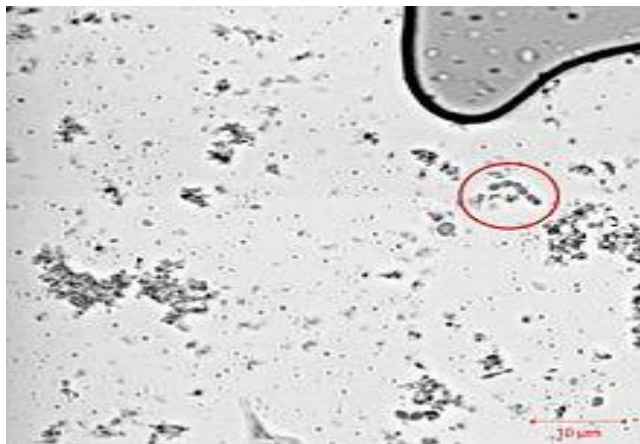
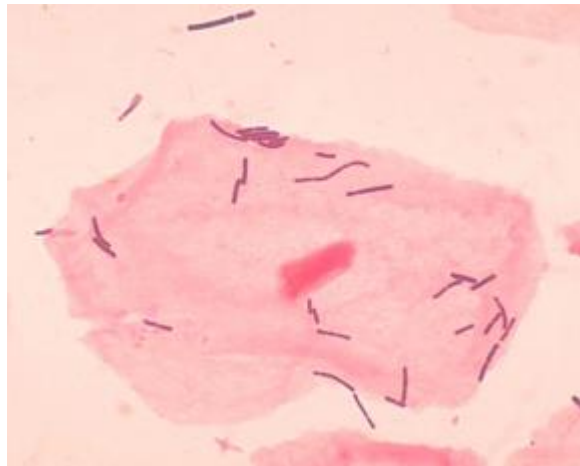


Figure 05 : *St. thermophilus* (coloration de gram)

#### 2.4.1.1.3.3. Les lactobacilles

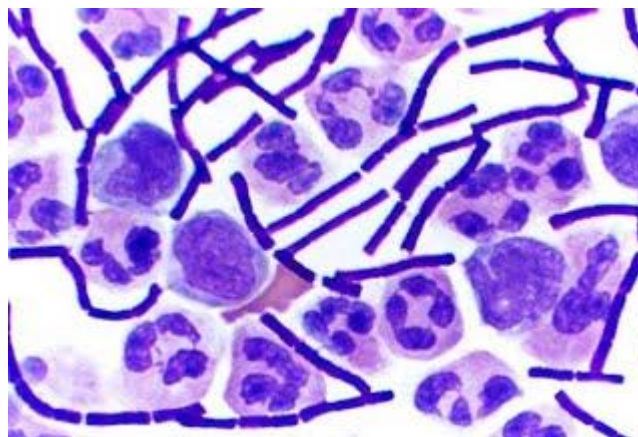
Les lactobacilles sont des bactéries asporulées, généralement immobiles, en forme bacille souvent allongées, groupées en paires ou en chaînes (Guiraud et Rosec, 2004). Les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares, certaines espèces comme *L. plantarum* donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres. Les lactobacilles cultivent également, bien que plus difficilement, sur gélose enrichie en sang frais ou cuit donnent de petites colonies sans zones d'hémolyse (Denis et al, 2007). Ils sont anaérobies facultatifs, mais poussent mieux sous atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO<sub>2</sub>, leur pH optimum de croissance est de 5,5 mais ils poussent aussi à pH neutre contrairement à *Carnobacterium*. Leur température optimale de croissance est généralement comprise entre 30 et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces. Néanmoins, une culture peut être observée à des températures allant de 2 à 53°C chez certaines espèces. (Figure 06)



**Figure 06:** Les lactobacilles (observation microscopique)

### ***Lactobacillus bulgaricus* : rôle dans le fromage**

*L.bulgaricus* est l'une des 2 bactéries nécessaires à la fabrication des yaourts et laits fermentés, elle a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques, et peut-être probiotiques de ces aliments, car elle produit de l'interféron, une protéine qui inhibe la réplication des virus envahisseurs pendant leur passage dans le tractus intestinal. Cette bactérie est bénéfique pour les cas de diarrhée aiguë et de sensibilité au lactose. Le génome de *L. bulgaricus* est estimé à 2,3 Mb et pourcentage de bases G et C d'environ 50. (**Figure 07**)



**Figure 07 :** *Lactobacillus bulgaricus* (coloration de gram (positif))

#### 2.4.1.1.4. La flore secondaire NSLAB (*Non Starter Lactic Acid Bacteria*)

Les *Pediococcus* ainsi que certaines espèces de *Lactobacillus* mésophiles homo- ou hétérofermentaires sont généralement désignés sous le nom de bactéries lactiques non-levain (en anglais NSLAB). Ces bactéries sont capables de croître dans des conditions sélectives lors de l'affinage des fromages. Cette flore tolère en effet l'environnement hostile de l'affinage, caractérisé par un très faible taux d'humidité dans le produit (61 à 68 % de matière sèche), 4 à 6 % de sel, un pH variant de 4,9 à 5,3 et une déficience en nutriments (Fox et al, 1998).

#### 2.4.2. Les bactéries d'affinage ou de surface

Les bactéries lactiques ne sont pas les seuls micro-organismes jouant un rôle dans la fabrication du fromage du genre camembert, C'est aussi des bactéries d'affinage « bactéries de surface ». Elles se retrouvent à leur surface, soit à un ensemencement naturel et/ou dirigé. Ces bactéries sont généralement aérobies se développent en présence d'oxygène, mésophiles et halophiles, elles croissent en milieu salé mais acido-sensible. Le pH en surface doit être supérieur à 5,5 pour permettre leur développement. Les bactéries de surface jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages, par leurs activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques conduisant à la formation de nombreux composés d'arôme dans la matrice fromagère et à la coloration de la croûte (Mahaut et al, 2000).

#### 2.4.3. Les Levures

Les levures sont présentes dans le lait cru mais elles sont détruites au cours de la pasteurisation. Les levures trouvées dans les fromages industriels proviennent donc essentiellement de la contamination par l'atmosphère et le matériel de fromagerie, et parfois par un ensemencement volontaire de surface. Elles se trouvent essentiellement sur la surface des fromages à pâte molle (Ex : camembert) qu'à l'intérieur. Les espèces de levures habituellement retrouvées dans les fromages de types Camembert sont *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*. *G. candidum* favorise la cohésion et le séchage de la croûte et libère des arômes typiques du camembert (Berger et al, 1999).

#### 2.4.4. Les Moisissures

Les moisissures ont un rôle très actif dans l'affinage de certains fromages comme les pâtes persillées et les pâtes molles, il existe deux types (Fredote. 2005).

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

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

✓ *Penicillium camemberti* (*P. camemberti*)

*P. camemberti* représente la principale moisissure utilisée dans la fabrication des fromages à pâte molle et à croûte fleurie car il possède donc certaines caractéristiques biochimiques qui en font un micro-organisme indispensable à leurs maturations.

## 2.5. Les Ingrédients utilisées

### 2.5.1. Présure

La présure est la substance permettant de faire cailler le lait. C'est une enzyme d'origine animale, nommée aussi « chymosine », elle est obtenue à partir du suc gastrique de la quatrième poche de l'estomac des jeunes veaux abattus non sevrés (**Eck, 1987**).

### 2.5.2. Levains lactiques

Les levains lactiques sont des cultures pures, ou mixtes, en proportions définies de différentes bactéries lactiques. Les ferments utilisés pour la fabrication de fromage comprennent principalement les genres des bactéries lactiques *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *streptocoques*, *lactobacillus* et *entérocoques*. On distingue couramment deux types de ferments : les mésophiles et les thermophiles.

A/ Les levains mésophiles (ex. *Lactococcus*, *Leuconostoc*) sont en général utilisés pour des variétés de fromage dont la température des caillés pendant la phase d'acidification ne dépasse pas 40 °C.

B/ Les levains thermophiles (ex. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*) sont plutôt employés dans des variétés de fromage où la température dépasse 40 °C en début de fabrication (**Parente et Cogan, 2004**). Dans les pâtes molles, les ferments lactiques principalement utilisés en industrie sont des bactéries mésophiles acidifiantes (*Lactococcus lactis*) ainsi que des bactéries thermophiles (*S. thermophilus*).

### 2.5.3. Les levains fongiques

Les levains fongiques, utilisés en fromagerie, peuvent être classés en quatre groupes: *Penicillium camembertis*, *P. roquerforti*, *Geotrichum candidum* et levures (**Eck et Gillis, 2006**). La sélection des levains se fait selon les caractères naturels et dans les pâtes molles, les ferments fongiques principalement utilisés en industrie sont *G. candidum* et *P. camembertis*.

### 2.5.3.1. *Geotrichum candidum*

Elle est utilisée comme ferment dans les fromages à pâte molle, *G. candidum* joue un rôle semblable à celui des autres levures : elle alcalinise la surface afin de permettre la croissance d'autres microorganismes qui ne tolèrent pas les faibles pH. Cette alcalinisation est associée à l'utilisation du lactate, mais surtout à la production d'ammoniac.

Sur les fromages de type Camembert, *G. candidum* a un impact sur la texture, la fermeté et l'épaisseur de la croûte formée. En effet, son mycélium assèche la surface des fromages, ce qui diminue le risque d'apparition d'une croûte collante (**Eliskases-Lechner F et al 2011**).

### 2.5.3.2. *Penicillium camemberti*

Cette moisissure a une activité protéolytique et lipolytique déterminant les caractères organoleptiques des fromages à l'étape de l'affinage. Elle est souvent désignée par les fromagers sous le nom de « *P. candidum* » (**Botton et al., 1990**).

### 2.5.4. Sels

L'addition du chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) a pour but de favoriser l'équilibre salin et d'améliorer la coagulation. Ainsi, l'enrichissement de la pâte en NaCl à raison de 1,7 à 2,5% apporte le goût caractéristique du fromage et agit sur l'activité de l'eau superficielle (**Mahaut et al , 2000**) (**Tableau 6**)

**Tableau 6** : Principaux groupes microbiens intervenant au cours de l'affinage du Camembert d'après **Lenoir et al 1983**).

Groupes microbiens	Origine	Fonction
<b>1-Bactéries</b> -STREPTOCOQUES LACTIQUES <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus Cremoris</i> <i>Streptococcus lactis Subsp</i> <i>Diacetylactis</i>	-Levain lactique	-Acidification
- LEUCONOSTOC	-Lait, éventuellement	-Production de composants

<p>-LACTOBACILLES <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i></p> <p>-MICROCOQUES</p> <p>BACTERIES CORYNEFORMES <i>Corynebacterium</i> <i>Brevibacterium</i></p>	<p>Levain</p> <p>-Lait</p> <p>-Lait, saumure, sel</p> <p>-Lait éventuellement levain</p>	<p>d'arôme</p> <p>-Production de composants d'arôme</p> <p>-Protéolyse, dégradation des acides aminés</p> <p>-Protéolyse, dégradation des acides aminés</p>
<p><b>-Levures</b> <i>Kluyveromyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Geotrichum candidum</i></p>	<p>-Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, éventuellement levain</p>	<p>-Production de composants d'arôme</p> <p>-Désacidification</p> <p>Protéolyse, lipolyse</p>
<p><b>-Moisissures</b> <i>Penicillium Camemberti</i></p>	<p>-Levain fongique</p>	<p>-Protéolyse, lipolyse, Production de composants d'arôme</p>

### 3. Taxonomie et présentation des microorganismes d'affinage

#### 3.1. Les levures

##### 3.1.1. Caractérisation et définition

Plus de cinquante espèces de levures différentes ont été répertoriées comme microflore naturelle dans les fromages. Elles sont en général très tolérantes aux faibles pH et peuvent se développer jusqu'à la neutralité. Certaines de ces espèces sont sélectionnées comme ferments

d'affinage et sont ajoutées au lait à une concentration variant entre  $10^4$  et  $10^6$  cellules (ou spores)/mL de lait. Étant donné la résistance des levures utilisées comme ferment à un pH acide (inférieur à 5) et à des concentrations en sel supérieures à 2-4 %, leur croissance est observable dans les premiers jours de l'affinage (**Leclercq-Perlat M et al 2004**)

### 3.1.2. Taxonomie et présentation des levures

La taxonomie des levures consiste essentiellement à :

- une classification des micro-organismes en groupes taxonomiques selon leur ressemblance et une similarité de séquence,
- la catégorisation de ces groupes définis,
- la description de nouveaux organismes.

La taxonomie se réfère souvent à l'approche systématique qui établit des différences et des relations entre les organismes afin de les caractériser et de les classer

#### 3.1.2.1. Le genre *Geotrichum*

##### 3.1.2.1.1. Les caractéristiques

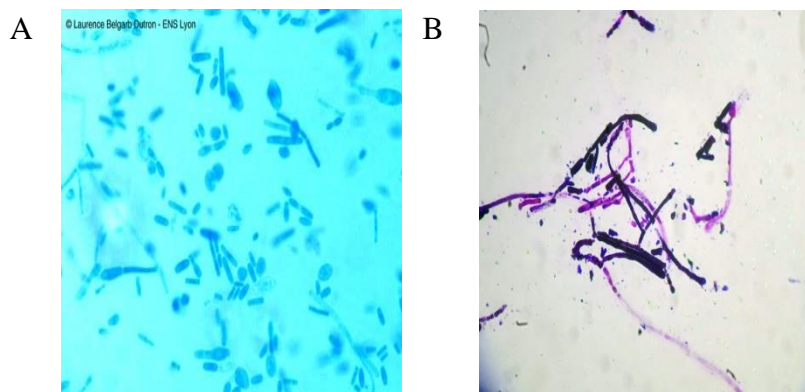
De nombreux auteurs ont continué à considérer *G. candidum* en tant que champignon filamenteux. Elle est pourtant décrite comme moisissure (**Wouters et al. (2002)**), En raison de sa morphologie semblable aux champignons et de sa position taxonomique particulière

Le morphotype levuriforme de *G. candidum* est caractérisé par des colonies crémeuses, de couleur blanc-crème, mais surtout par une production abondante de spores asexuées, les arthrospores. De son côté, le morphotype de moisissure se présente sous la forme d'un mycélium duveteux, feutrant et blanc. C'est sous cette forme que *G. candidum* produit des hyphes (**Eliskases-Lechner et al 2011**)

*G.candidum* produit des asques sur des hyphes indifférenciés sans cloisonnement visible, ou sur le même hyphe avec des gamétanges irrégulières. Un asque peut être formé d'une ascospore. Les ascospores sont globalement ellipsoïdales et ont une taille de  $4,0$  à  $5,5 \times 6-8 \mu\text{m}$ . (**de Hoog et Smith, 2011**),

##### 3.1.2.1.2. La classification

*G. candidum* est classée : le règne des Fungi, dans la division des Ascomycota, de la classe des Saccharomycetes, de l'ordre des Saccharomycetales, de la famille des Dipodascaceae, du genre *Geotrichum* et de l'espèce *candidum*. (**Figure 08**)



**Figure 08:** Morphologie de la levure : A : *Geotrichum* ; B : *Geotrichum candidum*

### 3.1.2.2. Le genre *Kluyveromyces*

#### 3.1.2.2.1. Les caractéristiques

Le genre *Kluyveromyces* se retrouve dans des environnements aussi diversifiés comme l'eau de mer et les produits laitiers. La caractérisation génétique grâce au caryotypage a permis de faire la distinction entre deux groupes : les levures dont le génome est divisé en 10 chromosomes ou moins, et celles dont le génome est divisé en 12 chromosomes, groupe aussi connu sous le nom de *Saccharomyces-like*.

Dans le premier groupe se retrouvent les *Kluyveromyces* laitiers, dont les espèces *Kluyveromyces lactis* (téléomorphe : *Candida sphaerica*) et *K. marxianus* (téléomorphe : *Candida kefir*). Ces levures possèdent un génome d'une taille de 10,6 Mb distribué sur six chromosomes, mais leur intérêt vient plutôt de la présence de gènes codant pour l'utilisation du lactose (Belloch et al 2011) (Figure 09)

#### 3.1.2.2.2. La classification

*K. lactis* est classée dans le règne des Fungi, dans la division des Ascomycota, de la classe des Saccharomycetes, de l'ordre des Saccharomycetales, de la famille des Saccharomycetaceae, du genre *Kluyveromyces* et de l'espèce *lactis*



**Figure 09 :** *Kluyveromyces lactis* (observation microscopique)

### 3.1.3. Méthodes d'identification physiologique et morphologique des levures

Il existe de nombreuses méthodes d'identification des microorganismes basées sur les caractéristiques phénotypiques et physiologiques. La combinaison de ces deux caractéristiques a traditionnellement été utilisée pour les études des levures.

#### 3.1.3.1. Les caractéristiques phénotypiques

Les caractéristiques phénotypiques analysées sont généralement la morphologie avec une observation au microscope pour déterminer le type de l'espèce (levure, champignon ou intermédiaire), la résistance au toucher, pour déterminer si une souche est grasse, poudreuse, libère de l'eau ou se décolle de la gélose, et la croissance (**Marcellino et al, 2001**).

#### 3.1.3.2. Les caractéristiques physiologiques

Les caractéristiques physiologiques étudiées sont généralement la fermentation de sucres, l'assimilation de sources de carbone, l'assimilation de huit sources d'azote, la croissance sur cycloheximide à 0,01 %, la croissance sur glucose 50 %, la thermo tolérance via test de croissance à quatre températures différentes : 30°C, 35°C, 37°C et 40°C, la production d'uréase sur milieu Christensen, la dégradation de l'arbutine, la dégradation d'amidon (pour certaines espèces), la sporulation, la résistance aux antifongiques ou l'osmotolérance.

### 3.1.4. Conditions de croissance des levures

#### 3.1.4.1. Sources nutritionnelles

Les nutriments sont apportés au milieu de culture de façon graduelle pour maintenir une faible concentration de glucose afin d'encourager la respiration et la reproduction cellulaire des levures. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des levures sont :

### 3.1.4.1.1. Sources de carbone

Il est maintenant bien établi que la plupart des levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie. D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles (éthanol, glycérol) (**Barnett, et al (2000)**). Cependant, leur croissance sur des substrats non-glucidiques les oblige à synthétiser des sucres exigés pour la biosynthèse macromoléculaire, en particulier celle des polysaccharides complexes (**Walker et al, 1997**).

### 3.1.4.1.2. Source d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**Guiraud, 1998**). L'assimilation des ions d'ammonium est largement répandue chez les levures. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés, comme source d'azote (**Walker et al, 1997**).

### 3.1.4.1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations.

Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de divers enzymes impliquées dans le métabolisme microbien. Ils sont nécessaires en très petites quantités mais un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (**Blom et al, 2000**). Les oligo-éléments augmentent la production de l'éthanol de 20% par *Sacharomyces cerevisiae*

De plus, d'autres facteurs sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (**Aguilar Uscanga, 2003**).

### 3.1.4.2. Les Facteurs physicochimique

#### 3.1.4.2.1. La température de croissance

Les températures d'incubations, sont généralement proches de celles qui permettent la propagation des levures dans leurs environnements naturels et se situent entre 25°C et 30°C. (**Vishniac et Hempfling, 1979**).

### 3.1.4.2.2. Le pH ou l'acidité

Les levures présentent une tolérance élevée aux pH extrêmes. Elles tolèrent des gammes très larges allant de 2.4 à 8.6. Entre ces valeurs, le pH intracellulaire est compris entre 5.8 et 6.8 (Bouix et Leveau, 1991).

### 3.1.4.2.3. L'oxygène O<sub>2</sub>

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène. Certaines levures sont aérobies strictes comme les genres : *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire comme ; *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* soit respiratoire comme ; *Candida*, les *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* et *Torulopsis* (Bouix et Leveau, 1991)

### 3.1.4.2.4. La pression osmotique et l'activité d'eau

La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Généralement, les levures résistent mieux que les bactéries à la pression osmotique. Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes (Bourgeois. et al, 1996).

## 3.1.5. Rôle des levures d'affinage dans les fromages de type Camembert

### 3.1.5.1. La croissance des levures à la surface des fromages

L'affinage des fromages est caractérisé par une succession de flores microbiologiques, Ils rapportent que les levures se développent pendant et après la période d'acidification par le ferment lactique.

Elles entraînent donc une modulation de la cinétique du pH en terminant la consommation du lactose (fin de la phase d'acidification, *Kluyveromyces lactis* et *Debaryomyces hansenii*) et en amorçant la consommation du lactate et la protéolyse (*Geotrichum candidum* et *D. hansenii*) (Spinnler et Gripon 2004).

### 3.1.5.2. L'utilisation du lactose et du lactate

Dans les fromages Camembert, la fermentation de ce lactose résiduel est possible grâce à la présence de *K. lactis* et de *D. hansenii*. *K. lactis* participerait à l'assimilation du lactose qu'à celle du lactate, grâce à aux enzymes  $\beta$ -galactosidase et lactose perméase (Larpin et al 2006). Dans un environnement où le lactose et le lactate sont présents, *K. lactis* préfère le lactose et débute l'assimilation du lactate seulement autour du 6e jour d'affinage

*Geotrichum candidum* utilise le lactate qui se diffuse du centre vers la surface des fromages dans les 12 premiers jours de la maturation fromagère pour son apport en énergie. Cette utilisation permet la neutralisation progressive du fromage (**Spinnler et Gripon (2004)**).

### 3.1.5.3. L'utilisation des lipides

La lipolyse est définie comme étant l'hydrolyse des lipides en acides gras libres (**Deeth 2011**). Elle contribue à trois caractéristiques organoleptiques majeures soit la texture, la solubilité de certains composés aromatiques et la production de précurseurs de saveurs (**Leclercq-Perlat 2007**). La voie de la lipolyse a été caractérisée comme étant la voie majeure du développement de saveurs, par exemple dans les fromages bleus (**Flicek et Birney 2009 ;**). La lipolyse observée dans le Camembert est causée par les estérases des bactéries lactiques du ferment, les lipases résiduelles du lait et les lipases de la microflore fongique.

*G. candidum* modifie les profils d'acides gras dans le Camembert grâce à ses lipases (**St-Gelais et Tirard-Collet (2002)**). L'activité lipolytique de *G. candidum* se mesure par la grande quantité d'acide oléique et d'autres acides gras insaturés à longue chaîne dans les fromages.

### 3.1.5.4. L'utilisation des protéines et des peptides

La protéolyse se définit comme étant l'hydrolyse des protéines et des peptides en acides aminés (**Upadhyay et al 2004**). Elle est le processus biologique le plus complexe et le plus important qui a lieu pendant l'affinage des fromages. En plus, la protéolyse joue un rôle majeur dans le développement des saveurs du fromage en générant de courts peptides ainsi que des acides aminés libres qui seront éventuellement transformés en composés d'arômes (**Upadhyay et al 2004**). Dans les fromages Camembert, la protéolyse et l'assimilation des acides aminés libres ont longtemps semblé difficiles à évaluer pour *G. candidum* étant donné qu'elles étaient beaucoup plus faibles que pour *Penicillium camemberti*

## 3.2. Taxonomie et présentation des Moisissures

### 3.2.1. Généralité et définition

Les moisissures sont des microorganismes aérobies obligatoires qui s'établissent surtout à la surface des fromages. Semblables aux levures pour ce qui est condition et des substrats de croissance, les moisissures sont cependant toutes des microorganismes sont cependant toutes des microorganismes aérobies obligatoires. Ainsi elles s'établissent surtout à la surface des fromages. (**Champigny, 2011**).

En fromagerie, les deux principales espèces de *Penicillium* utilisées pour leurs caractères technologiques sont *P. camemberti* et *P. roqueforti*. Elles sont respectivement utilisées pour les fromages Camembert et les fromages bleus. *P. camemberti* est une moisissure filamenteuse qui confère aux fromages à pâte molle et à croûte fleurie leur aspect blanc uniforme et duveteux.

### 3.2.2. Taxonomie des moisissures

Le terme « moisissures » Il désigne tous les champignons d'aspect filamenteux ou poudreux. Les moisissures peuvent être définies comme étant des microorganismes hétérotrophes (Nicklin et al 2000).

Ces microorganismes nécessitent une source de carbone et d'azote pour leur développement. Dans la classification du monde vivant, les mycètes constituent un règne distinct de celui des végétaux et des animaux

Le règne des « champignons vrais » ou Fungi, appelé Eumycota, comprend actuellement 1 sous-règne, 7 divisions et 10 sous-divisions. On distingue ainsi : -mycota pour la division, -mycotina pour la sous-division, -mycètes pour la classe, -ales pour l'ordre, et -aceae pour la famille.

#### 3.2.2.1. *Penicillium camemberti*

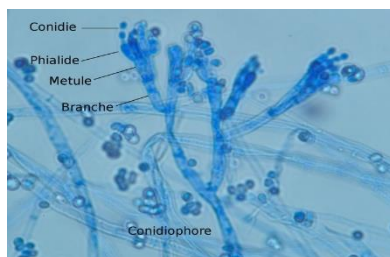
##### 3.2.2.1.1. Les caractéristiques

*P. camemberti* est la moisissure des fromages à pâte molle et à croûte fleurie de type Camembert. C'est une moisissure filamenteuse, aérobic stricte, sensible aux teneurs en dioxyde de carbone trop élevées. Elle est considérée comme peu sensible au sel bien que cette propriété soit variable d'une souche à l'autre. (Leclercq Perlat et al, 2006).

*P. camemberti* est une moisissure qui peut croître à des températures de 4 à 37 °C, à un pH entre 2 et 8,5 (avec un optimum entre 3,5 et 6,5), des caractéristiques générales de croissances similaires à celles de *P. roqueforti* (Abbas et Dobson (2011)). Non seulement elle tolère 20-25 % de NaCl, mais une concentration autour de 2 % stimule sa croissance. Elle est donc adaptée aux conditions fromagères.

##### 3.2.2.1.2. La classification

*P. camemberti* est classé dans le règne des *Fungi*, dans la division des *Ascomycota*, de la classe des *Eurotiomycetes*, de l'ordre des *Eurotiales*, de la famille des *Trichocomaceae*, du genre *Penicillium* et de l'espèce *camemberti*. (Figure 10).



**Figure 10 :** *Penicillium camembertii* (observation microscopique)

### 3.2.3. Conditions de croissance des moisissures

#### 3.2.3.1. Sources nutritionnelles

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996)

##### 3.2.3.1.1. Source de carbone et d'énergie

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Nicklin et al, 2000). Certaines d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol.

##### 3.2.3.1.2. Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels ( $\text{NH}_4^+$ ) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformée en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination. (Boiron, 1996).

### 3.2.3.1.3. Eléments minéraux

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (**Uchicoba et al, 2001**). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc.

### 3.2.3.2. Facteurs physicochimique

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

#### 3.2.3.2.1. La Température de croissance

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient dans la sporulation et la germination des spores. La plupart des moisissures sont mésophiles et la température de croissance varie entre 25 à 35°C. D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (**Nicklin et al, 2000**).

#### 3.2.3.2.2. Le pH ou l'acidité

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0. Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques. Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs soit directement par action sur la membrane cellulaire.

#### 3.2.3.2.3. L'activité de l'eau ou l'humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes. Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (**Bourgeois, 1989**).

### 3.2.4. Méthodes d'études des moisissures

#### 3.2.4.1. Méthodes phénotypiques

##### 3.2.4.1.1. Méthodes d'identification des moisissures

L'identification des moisissures en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire.

###### 3.2.4.1.1.1. Analyse macroscopique

Plusieurs aspects de l'appareil végétatif peuvent être observés après culture des champignons filamenteux :

- l'aspect : duveteux, laineux, cotonneux, velouté, poudreux, granuleux ou glabre.
- le relief : plat, plissé ou cérébriforme.
- la taille : petite, étendue ou envahissante.
- la couleur : blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grises...).

La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres telle la vitesse de la pousse des colonies ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification d'une moisissure.

###### 3.2.4.1.1.2. Analyse microscopique

Lors de l'analyse microscopique des colonies, plusieurs structures des champignons filamenteux sont observées comme l'appareil végétatif, les organes de fructification et les spores :

- le thalle végétatif : septé ou siphonné, paroi pigmentée (mélanisée) ou non (hyaline).
- les organes de fructifications: présence ou non d'organes protecteurs des conidies, modes de formation des conidies ou en chaînes (arthrospores), ou produites par bourgeonnement et regroupées soit en grappes, en masse, en têtes ou en chaînes basipètes ou acropètes)
- les spores : endogènes (endospores) ou exogènes (conidiospores ou conidies),

### 3.2.4.1.3. Analyse moléculaire

Les méthodes d'identification des champignons filamenteux par biologie moléculaire reposent sur l'analyse des séquences portant l'information génétique (**Verscheure et al 2002**). L'émergence de la PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis d'importants progrès des techniques moléculaires.

Plusieurs techniques sont appliquées : la RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) est basée sur le polymorphisme de taille des fragments de restriction et a été utilisée pour la discrimination d'espèce d'*Aspergillus* la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), basée sur le polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard, a permis de mettre en évidence une différenciation des souches de *Penicillium roqueforti* (**P.H. Garthwaite 1994**), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Récemment, une nouvelle méthode d'analyse phénotypique comme outil d'identification des champignons filamenteux en routine. Cette technique qui repose sur la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS), permet d'obtenir sous forme de spectre le profil protéique des champignons filamenteux.

### 3.2.5. L'intérêt technologique de *P. camemberti* dans les fromages de type Camembert

*P. camemberti* est d'abord utilisé pour recouvrir la surface des fromages affinés de façon à les protéger des contaminations exogènes pouvant altérer l'aliment ou être nuisibles à la santé humaine. Cette fonction de recouvrement plus ou moins dense vient du caractère pénétrant ou rampant des hyphes produits dans le mycélium (**Taniwaki et al 2006**)

#### 3.2.5.1. L'utilisation du lactose et du lactate

*P. camemberti* possède les enzymes nécessaires à la consommation du lactose (**Husson et al 2005**), mais il assimilerait le lactate pendant la croissance cellulaire, comme source de carbone pour sa biosynthèse (**Adour et al 2004**) En effet, la diminution de la concentration en lactate a été associée à la croissance de *P. camemberti* et à sa production de spores. C'est sa capacité à utiliser le lactate pour produire du CO<sub>2</sub> qui permet la neutralisation du fromage de même qu'une modification de l'atmosphère de la chambre d'affinage.

### 3.2.5.2. L'utilisation des lipides

*P. camemberti* est reconnu pour sa grande activité lipolytique. Cette moisissure possède une lipase alcaline, qui est donc active à un pH de 8-9 (**Rattray et Eppert (2011)**). La lipolyse observée chez *P. camemberti* permet la libération d'acides gras tels que l'acide 2-méthylpropanoïque, l'acide butanoïque, l'acide 2-méthylbutanoïque, l'acide 3-méthylbutanoïque, l'acide pentanoïque, l'acide hexanoïque et l'acide octanoïque. Les souches de *Penicillium* mettent aussi en œuvre la voie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras libres pour former une variété de méthylcétones qui dépend de la concentration initiale d'acides gras libres, mais aussi du stade de croissance du mycélium et du milieu de culture utilisé.

### 3.2.5.3. L'utilisation des protéines

Le genre *Penicillium* est aussi connu comme ayant une activité protéolytique importante au cours de l'affinage. La protéolyse est observée à partir du 6 jour d'affinage de Camemberts et augmente rapidement pendant 45 jours qui est en accord avec l'augmentation de la population fongique à la surface des fromages (**Engel et al 2001**).

Le système protéolytique de *Penicillium camemberti* se compose d'une variété d'enzymes spécifiques. Il comprend une métalloprotéase (MP) extracellulaire, une aspartylprotéase (AP) active à pH acide, des carboxypeptidases acides, une carboxypeptidase neutre et des aminopeptidases (**Spinnler et Gripon 2004**).

## 4. Les différents types d'interaction

Il existe deux types d'interactions entre micro-organismes : directe et indirecte. Comme leur nom l'indique les interactions directes impliquent un contact physique entre deux populations. Il s'agit des interactions de prédation, parasitisme et inhibition par contact direct entre micro-organismes. Les interactions indirectes sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme et la compétition.

## 4.1. Interactions directes

### 4.1.1. Prédation et parasitisme

Pour ces deux types d'interactions, une des espèces vit aux dépens de l'autre. Dans le cas de la prédation, la proie devient un substrat totalement digéré par le prédateur. Alors que dans le cas du parasitisme, seule une partie des tissus de la victime est consommée. Ainsi les bactéries peuvent être parasitées par des virus (**Arendt et al. 1991**).

### 4.1.2. Inhibition par contact direct entre les cellules

Dans ce type d'interaction, une population microbienne est inhibée par une autre, ceci par un contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni de la limitation en nutriment ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée en cellules viables (**Nehmé, 2008**). L'existence de ce type d'inhibition par contact direct chez la souche *Kluyveromyces thermotolerans* et chez la souche *Torulaspora delbrueckii* en culture mixte avec *S. cerevisiae*. Néanmoins, les mécanismes de cette inhibition restent inconnus.

## 4.2. Interactions indirectes

### 4.2.1. Mutualisme

Le mutualisme est classé en deux types : mutualisme (symbiose) et synergisme (protocoopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le cas de la symbiose la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre, alors que dans le cas de la proto-coopération l'absence d'un des microorganismes n'est pas fatale pour l'autre, mais leur présence ensemble stimule et améliore leur développement. D'ailleurs, il a été observé récemment que la croissance des pro-biotiques lactiques du lait (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*) avec *Streptococcus thermophilus* est meilleure en co-culture (avec contact direct) qu'en culture pure de chacune des bactéries. Ceci prouve la présence d'une synergie entre le métabolisme de *S. thermophilus* et le métabolisme des autres bactéries lactiques (**De Souza Oliveira et al, 2009**).

#### 4.2.2. Neutralisme

La présence d'une population n'affecte pas l'autre. Aucun changement dans la croissance des populations n'est observé dans le cas du neutralisme. Ce type d'interaction n'est possible que si aucun des substrats n'est limitant ou si les espèces ont des besoins nutritionnels totalement différents.

#### 4.2.3. Commensalisme

Une des populations profite de la présence de l'autre. Cela peut avoir lieu si une des populations produit une substance nécessaire pour la croissance de l'autre ou si une des populations consomme une substance inhibitrice de la croissance de l'autre.

#### 4.2.4. Compétition

Les populations se développent sur le même substrat et consomment toutes un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance. L'exemple de la compétition entre les levures et les bactéries lactiques est souvent cité. En effet, au début de la fermentation alcoolique au niveau de laquelle la croissance des bactéries lactiques s'arrête rapidement aux profits du développement des levures. Les bactéries lactiques, principalement *C. æni*, se développent après la fermentation alcoolique, lorsque *S. cerevisiae* entre en phase de croissance stationnaire et relargue des facteurs de croissance (Lonvaud-Funel et al, 1988).

#### 4.2.5. Amensalisme

Une des populations produit une substance ayant un effet négatif sur la croissance de l'autre. Cette situation est semblable à la compétition exceptée que dans le cas de l'amensalisme une des populations n'est pas affectée par l'interaction. Le cas typique d'amensalisme chez les levures est la toxine killer produite par certaines souches de *S. cerevisiae* et qui entraîne la mort des souches sensibles (Ramon-Portugal et al, 1994). Une autre relation d'amensalisme entre levures a été observée entre *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Cette dernière semble capable d'inhiber la croissance de *S. cerevisiae* et d'augmenter sa mortalité.

# **CHAPITRE II**

## Matériel et méthode

### 1. Description de l'entreprise (GIPLAIT) organigramme

Le groupe industriel des productions laitières GIPLAIT/SBA a été créé en Mai 1998, à l'issue de la restriction des Ex. Offices Régionaux (ORLAC, OROLAIT, ORELAIT). Il a pour mission la production et la commercialisation des laits et produits laitiers. Son capital avoisine les 20 Milliards de Dinars et son effectif de 4.099 salariés. Les capacités de production installées sont de l'ordre de 1,4 Milliards de litre de lait équivalent.

La wilaya de Sidi Bel Abbés a enregistré une production de 68 millions de litres de lait en 2012 contre 38 millions de litres en 2011, selon les services agricoles de la wilaya. La production laitière à Sidi Bel Abbés assure actuellement une autosuffisance à l'échelle locale, dépassant les besoins des habitants de la wilaya qui commercialise le surplus dans les wilayas d'Oran et d'Ain T'émouchent.

La société mère située à Alger, est gérée par un Directoire et Quatre Directions centrales (Administration et Ressources Humaines, Finances et Comptabilité, Contrôle de Gestion). Cette filiale est implantée un peu partout dans le pays dans presque toutes les régions, Filiale du TESSALA / SBA. (**Figure 11**).

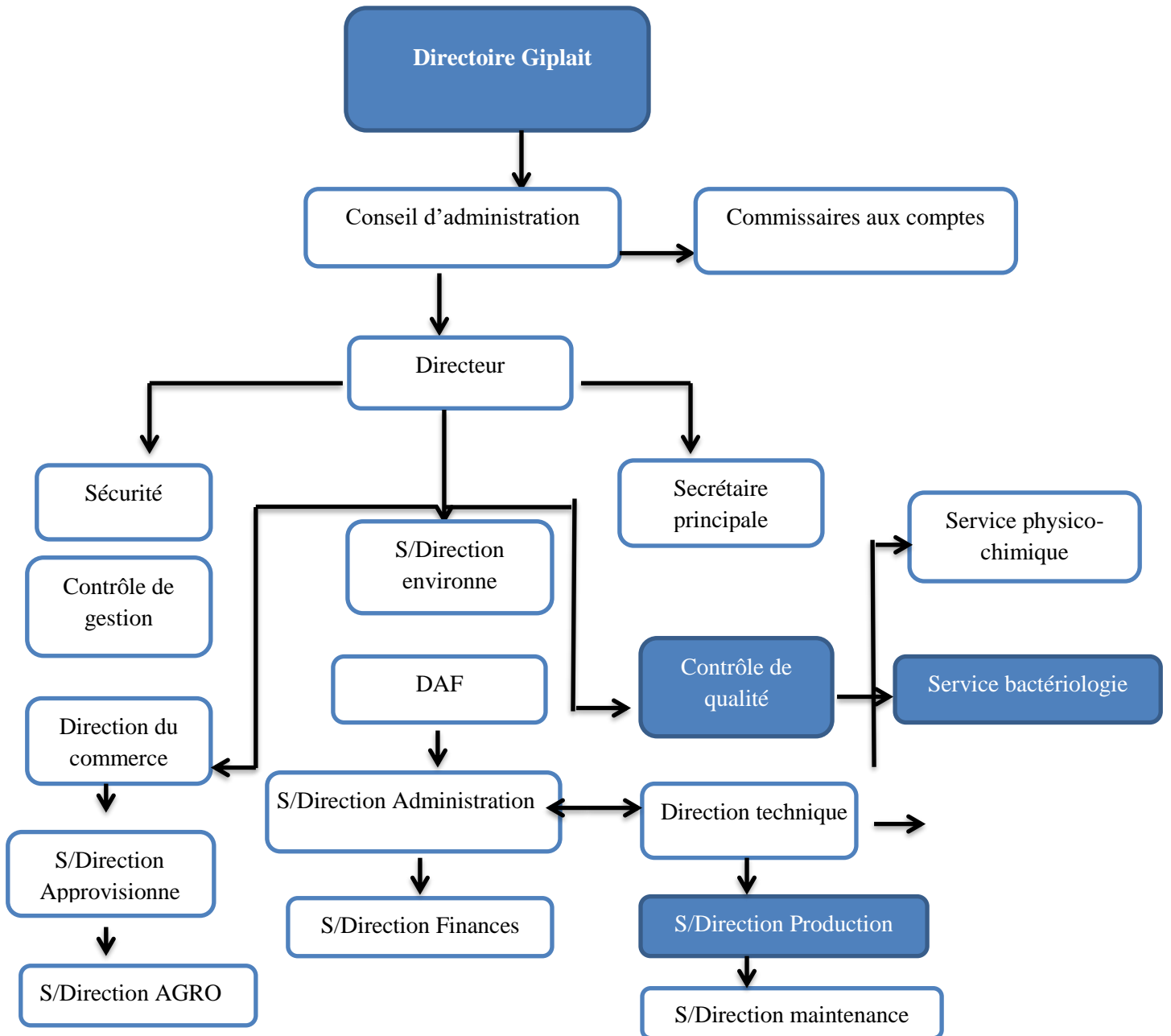


Figure 11. .l'organigramme générale de la filiale (source : GIPLAIT-SBA)

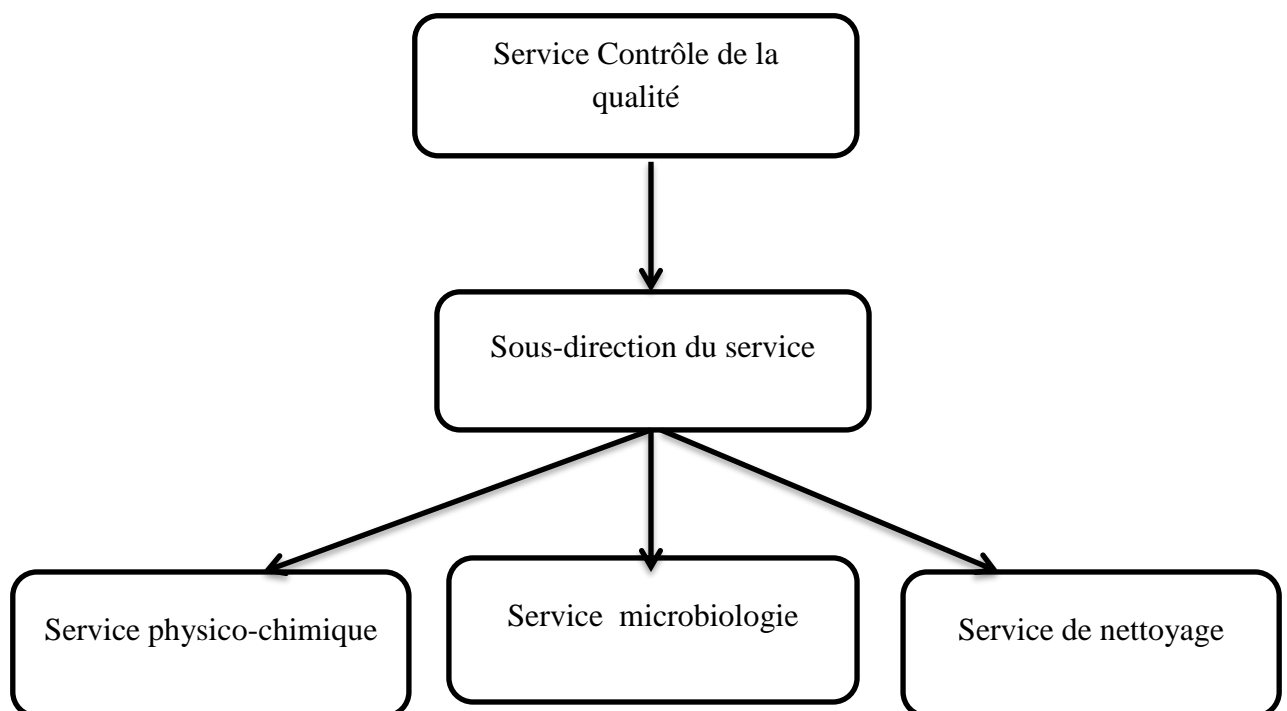
La laiterie TESSALA est spécialisée dans la production d'une gamme de produits assez diversifiée : lait pasteurisé partiellement écrémé et entier (lait de vache pasteurisé), le petit lait (EL laben), crème fraîche, fromages à pâte molle type camembert, autres fromages et le beurre.

Actuellement l'entreprise (GIPLAIT) est subdivisée en plusieurs services d'activités en plus de la Direction Centrale autres sous-directions liées à la production, commercialisation, la qualité est sous l'autorité de DG

### 1.1. La sous-direction de la qualité

#### 1.1.1. L'organisation du service de Contrôle de Qualité

Le service de Contrôle de Qualité est organisé de la manière suivante : une Secrétariat avec deux laboratoires d'analyses, le laboratoire d'analyses physico-chimique et le laboratoire d'analyses microbiologiques. La mission principale de ce service le contrôle de la qualité microbiologique et physico-chimique des produits fabriqués et réceptionnés par l'entreprise à savoir les matières premières et les produits finis.(Figure 12)



**Figure 12.** Organisation du service du contrôle de la qualité (source : GIPLAIT – SBA)

# Matériels et méthodes

**Méthodologie envisagée pour la réalisation de l'objectif tracé dans ce mémoire.**

*Vu la crise sanitaire qui a touchée notre pays par l'apparition du COVID-19 l'ensemble des travaux au niveau de laboratoire ont été suspendus. Nous résumons l'ensemble des méthodes prévues sous forme d'une partie théorique.*

## **Méthodologie**

*Les étapes effectuées pendant la réalisation de notre mémoire sont :*

- *Le suivi des étapes de fabrications du fromage à pâte môle type camembert fabriqué par l'unité de TASSALA de Sidi bel Abbès.*
- *Des prélèvements des échantillons ont été réalisés sur le fromage à pâte môle type camembert.*

*Les étapes non effectuées portent sur :*

*Les analyses envisagées d'être réalisé dans ce mémoire portent sur l'isolement et caractérisation par des méthodes phénotypiques et biochimiques de microorganismes impliquées dans l'affinage du fromage, qui se résument comme suit :*

1. *Les méthodes phénotypiques tracées s'articule autour de l'étude de l'aspect macroscopique et microscopique des souches*
2. *Les méthodes physiologiques tracées portent sur l'étude de production de l'enzyme catalase et production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose des souches.*
3. *Enfin, nous avons envisagé de réaliser une identification des souches par l'utilisation des caractères biochimiques soit classique soit par l'utilisation de galerie API système.*

## 2.1. Méthodes de prélèvement et échantillonnage

### 2.1.1. Lieu d'étude et de prélèvement

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de contrôle de la Qualité de la laiterie « GIPLAIT TESSALA » de Sidi-Bel- Abbés (**Figure 13**)



**Figure 13.** Laiterie TESSALA de Sidi bel abbés (lieu de prélèvement)

### 1.1.2. Echantillonnage

Trois (03) échantillons du fromage à pâte molle type camembert ont été prélevés durant son affinage (Après deuze (12) jours d'affinage). Ces échantillons ont été choisis de façon aléatoire du même lot de fabrication avec les mêmes caractéristiques (**Figure 14**). Le fromage à pâte molle type camembert a été fabriqué au niveau de l'unité de production (GIPLAIT de Sidi bel abbés) selon le processus de fabrication installé dans l'unité. Pour l'ensemble des prélèvements, les analyses ont été réalisées sur le cœur (partie intérieure du fromage) et sur le croute (partie extérieure du fromage) trois portions ont été prélevées dans chaque fromage avec une sonde stérile.



**Figure 14.** Prélèvement du fromage à pâte molle type camembert

### 3. Méthodes d'analyse microbiologiques utilisées pour le contrôle du fromage à pâte môle

#### 3.1. Méthodes d'analyse des levures et des moisissures

##### 3.1.1. Méthodes d'isolement

Les levures et les moisissures sont isolées sur milieu Sabouraud. L'ensemencement est fait en masse. Ces micro-organismes peuvent provoquer des accidents de fabrication comme la détérioration du goût, le gonflement et le défaut de texture.

##### 3.1.1.1. Préparation de la solution mère et des dilutions du fromage

Les trois échantillons de fromage à pâte molle type camembert ont subi une préparation en vue de leur analyse. Une portion d'environ 1gr de fromage de chaque trois unités est prélevée du cœur (partie intérieure du fromage) et sur la croûte (partie extérieure du fromage) à l'aide d'un perçoir puis broyée dans un mortier et homogénéisée avec 9 ml d'eau physiologique d'où le broyat obtenu correspond à la suspension fromagère. Ce dernier est bien homogénéisé pour la préparation de la solution mère et des dilutions (juste 10<sup>-1</sup> pour chaque échantillon). Pour éviter les contaminations de l'échantillon, les préparations du dénombrement des micro-organismes sont effectués dans la zone stérile avec du matériel flambé. **(Figure 15)**

##### 3.1.1.2. Dénombrement des levures et moisissures

Le dénombrement a été réalisé sur milieu gélosé Sabouraud. 1 ml de la dilution mère (10<sup>-1</sup>) a été ensemencé et les boîtes ont été incubées pendant 5 jours à une température de 22 C°. Les résultats positifs se manifestent par l'apparition des petites colonies blanches et brillantes avec une odeur spécifique pour les levures et un mycélium pour les moisissures. **(Figure 16).**

:



Figure 15 : Méthode de dénombrement décimale

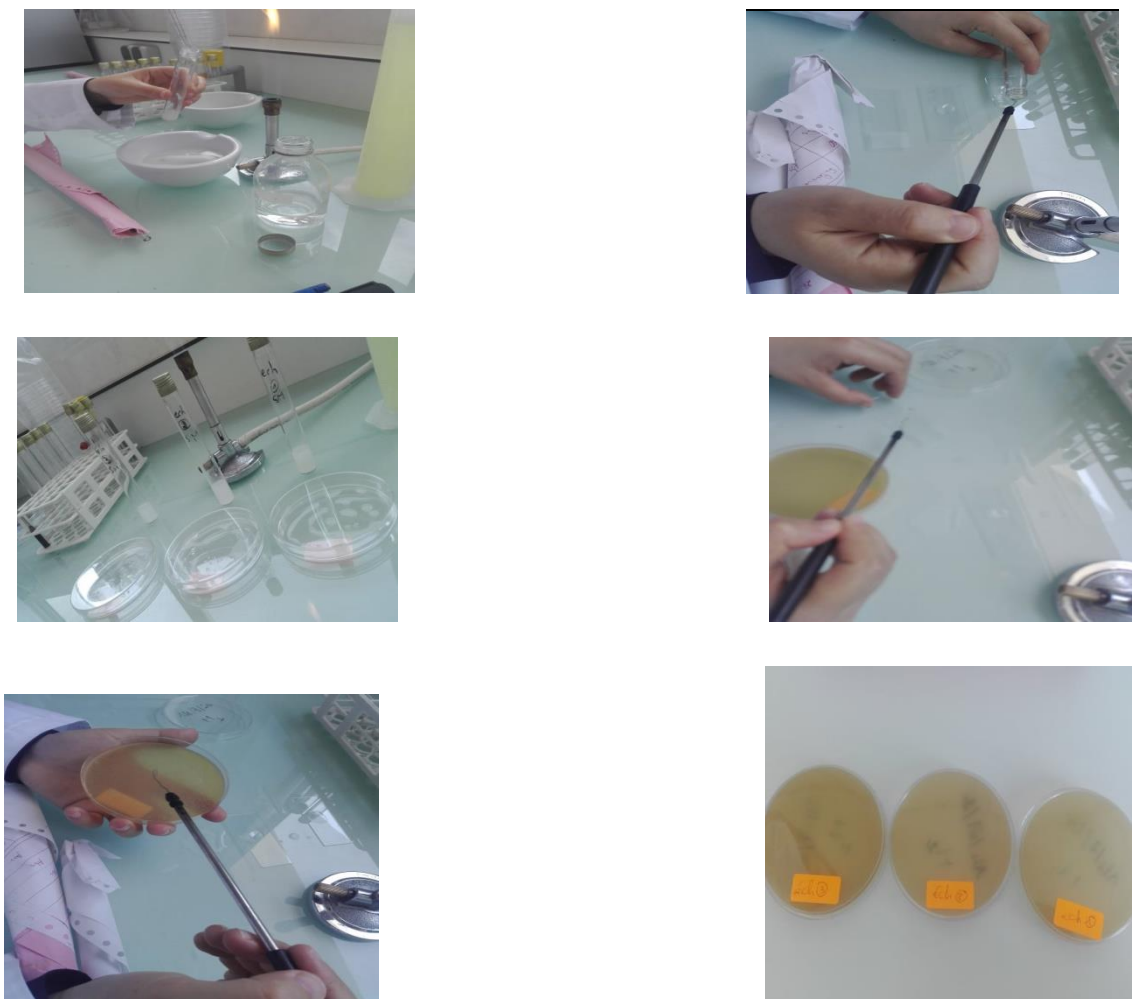


Figure 16 . Les Etapes de preparation de la dilution mere et dénombrement

### 3.1.2. Méthodes macroscopiques et microscopiques des levures et moisissures

#### 3.1.2.1. Méthodes macroscopique

**L'aspect macroscopique des levures :** arrondies, brillantes, plates ou convexes à contours réguliers, elles sont pigmentées en jaune, en orange ou en blanc

**L'aspect macroscopique des moisissures :** pigmentées sous forme filamenteuse plus ou moins grand à aspect velouté

#### 3.1.2.2. Méthodes microscopiques

##### **L'aspect microscopique des levures :**

L'observation microscopique des levures permet d'observer la forme cellulaire de ces microorganismes. En effet, les cellules de levures sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques. Leur taille va de 2 à 3 microns et même jusqu'à 5 microns chez certaines espèces de levures. Les cellules peuvent après bourgeonnement rester liées les unes aux autres et constituer aussi un pseudo mycélium. Plus ou moins différencié suivant les genres ou les espèces. Dans certaines conditions, d'autres levures peuvent produire de mycéliums caractéristiques de champignons filamenteux, comportant des cloisons transversales ou septa et présentant une croissance apicale (**Bourgeois et al, 1988**).

##### **L'aspect microscopique des moisissures**

Les études microscopiques sont faites à partir d'un échantillon monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de colorant.

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques des hyphes et des structures de reproduction. Généralement les hyphes sont de couleur, présence ou non de cloisons, diamètre approximatif, structures particulières.

Organes de reproduction (1 ou plusieurs types) : localisation (partie aérienne, ...), couleur, taille et forme des organes de reproduction.

Structure et disposition des spores : couleur, forme, cloisons, ornementation, taille.

### 3.1.3. Méthodes biochimiques et micro-méthodes

#### 3.1.3.1. La méthode API Candida (Système API pour les levures)

Le système API Candida est un système standardisé permet l'identification après 18 à 24 h d'incubation des levures présentent dans un échantillon étudié.

##### 3.1.3.1.1. Principe du système Api Candidat

La galerie API Candida comporte 10 tubes contenant des substrats déshydratés, pour réaliser 12 tests d'identification (acidification de sucres ou réactions enzymatiques).

Les réactions produites durant l'incubation se traduisent par des virages colorés.

La lecture des réactions se fait à l'aide d'un tableau de référence ou par utilisation un logiciel d'identification établi par le fabricant du système.

##### 3.1.3.1.2. Présentations de la galerie API Candida pour les levures (Figure 17)

- 10 galeries API Candida
- 10 ampoules d'API Na Cl 0,85 % Medium (2 ml)

Description du système API Candida



**Figure 17** .La galerie API Candida pour les levures

### 3.1.4. Méthodes biochimiques et micro-méthodes (API système pour les moisissures)

Des tests biochimiques peuvent être utilisés pour identifier les moisissures. Les principaux systèmes API commercialisée et utilisé pour l'identification des moisissures, on peut citer : la galerie API (20C ou ID 32C), les tests en plaque Biolog TM.

La technologie Biolog TM utilise des microplaques 96 puits prêts à l'emploi avec 95 substrats carbonés de 6 à 8 classes différentes pour une meilleure discrimination. La capacité d'un isolat à métaboliser chaque substrat est mesuré par la présence ou l'absence d'une coloration rouge pour les champignons filamenteux.

Cette coloration est due à l'oxydation de l'iodonitrotetrazolium par la respiration cellulaire des micro-organismes. Le virage de certains puits crée une empreinte phénotypique qui est analysée par le logiciel pour identifier un organisme. L'utilisation de test Biolog s'accompagne souvent d'observations macroscopiques et microscopiques.

L'identification biochimique des moisissures ne permet pas une identification fiable et nécessite souvent une confirmation d'identification moléculaire. C'est pourquoi, de nombreuses méthodes moléculaires d'identification ont été développées afin de permettre une meilleure identification des moisissures.

### 3.1.5. La galerie API 20 C AUX (ce test pour les moisissures)

API 20 C AUX est un système d'identification précise des moisissures les plus couramment rencontrées (**Figure 18**).

#### 3.1.5.1. Principe

La galerie API 20 C AUX est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation. Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum semi-gélosé et les moisissures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait par comparaison aux témoins de croissance et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

3.1.5.2. Identification des moisissures en 24-48 h

Tests d'assimilation constituant les tests de référence pour l'identification des moisissures  
 Utilisation facile : un contrôle positif et un contrôle négatif pour une lecture plus facile,  
 absence de réactifs additionnels, Base de données très étendue couvrant la très grande  
 majorité des moisissures isolées de prélèvements humains ou vétérinaires, Conditionnement :  
 coffret de 25 galeries + milieu

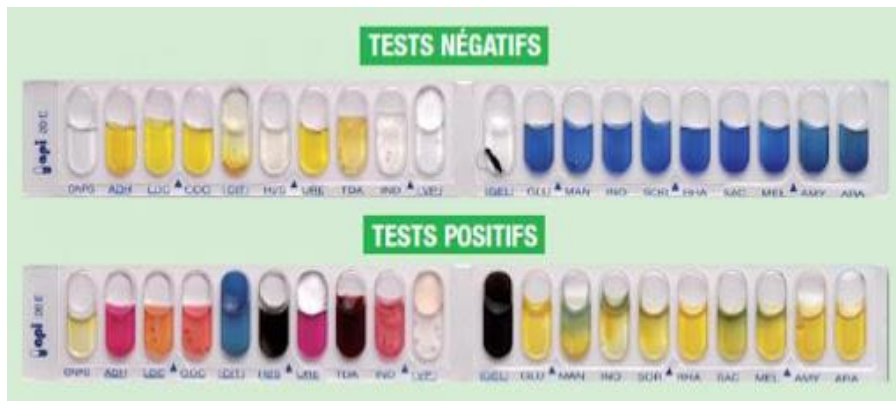


Figure 18. La galerie API 20 C AUX pour les moisissures

# **Conclusion**

# CONCLUSION

---

## Conclusion

Vu la crise sanitaire qui a touchée notre pays par l'apparition du COVID-19 l'ensemble des travaux au niveau de laboratoire ont été suspendus. Notre mémoire a été rédigé sous forme de deux parties théoriques. La première partie sur une synthèse bibliographique détaillée sur le lait comme matière première destiné pour la fabrication des produits de transformation et le fromage à pâte môle type camembert comme produit objet de notre étude. L'affinage du fromage résulte principalement de l'action de différents micro-organismes qui participent à la transformation du caillé en fromage. L'évolution et l'activité de cette flore sont très influencées par les conditions d'affinage (température, humidité relative et composition gazeuse des hâloirs). Notre but a été tracé dans ce contexte. Pour vérifier cette problématique nous avons prévu une méthodologie. Les méthodes envisagées d'être réalisées dans ce mémoire pour l'isolement et identification des microorganismes impliquées dans l'affinage du fromage type camembert fabriqué par unité TESSALE de Sidi Bel Abbès portent sur des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques de microorganismes. En guise de perspectives, nous envisageons que ce travail font être suivi dans les prochaines années par une étude expérimentale pour mettre en évidence l'effet de la flore d'affinage sur la qualité nutritionnelle et organoléptique de ce produit.

# **Référence bibliographique**

# Référence bibliographiques

## A

- **Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris
- **Anonyme., (2009) :** Traite des vaches laitières : Matériel, installation, entretien. 1ereédition.France Agricole, institut de l'élevage : 554p
- **Anonyme (1995).** FOA. Organisation des nations unies pour alimentation et l'agriculture, catalogage avant publication de la bibliothèque Davide Lubin, Italie. 179-186 p.
- **Abbas A, Dobson ADW (2011)** Yeasts and Molds | *Penicillium roqueforti*. In: Editorin-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 772-775.
- **Adour L, Couriol C, Amrane A (2004)** The effect of lactate addition on the growth of *Penicillium camemberti* on glutamate. J Biotechnol 114: 307-314
- **Aguilar Uscanga, B-R., 2003.** Influence des paramètres de croissance et des conditions de mise en œuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse INSA Toulouse.
- **Acker L.X. (1996).** Le phénomène microbiologiques et enzymatiques de la biologie de l'affichage ; in : « le fromage » technique et documentation, Lavoisier, 3ème édition, paris.
- **Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P. et Simpson, R. (2002).** Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait in Science et Technologie du lait ; Transformation du lait. Éditions presses international polytechnique, Montréal
- **Arendt EK, Neve H, Hammes WP (1991)** Characterization of phage isolates from a phagecarrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 220-224.

## B

- **Baudry C. et Brezellec H. 2006.** Microbiologie, immunologie. Wolters Kluwer. France. p. 36-38
- **Belloch C, Querol A, Barrio E (2011)** Yeasts and Molds | *Kluyveromyces* spp. In: Editor-in-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 754-764

- **Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier Ph, Guy,larpent J-P, Reymond P, Sanglier J-J,Vassier Y et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Edition: Masson. Paris. 512p.
- **Bourgeois CM, Mescle J-F, Zucca J et Larpent JP. (1989).** Microbiologie alimentaire: Les fermentations alimentaires. Editions : Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 796p.
- **Berger C., Khan J.A., Molimard P., Martin N.et Spinnler H.E. (1999).** Production of sulfur flavors by ten strains of Geotrichum candidum. Appl Environ Microbiol, 65 : 55105514p.
- **Benayache S., (2016).** Étude des variations biochimiques du lait et de sang chez les vaches laitières en fonction de l'alimentation. Mémoire de Magistère en Sciences vétérinaires, université des frères Mentouri Constantine, 102p.
- **Bourgeois. C-M, Mescle. J-F. et Zucca. J, 1988.** Microbiologie alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires, Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 8, p : 161-171
- **Bourgeois. C-M, Mescle. J-F, Zucca. J, 1996.** Microbiologie alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. 2 ème Edition Ed. Tec & Doc. PP: 672.
- **Bouix .M. et Leveau J-Y, 1991.** Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229.
- **Blom, J., Mattos, M.J.T.D., et Grivell, L.A., 2000.** Redirection of the RespiroFermentative Flux Distribution in Saccharomyces cerevisiae by Over expression of the Transcription Factor Hap4p. Appl. Environ. Microbiol. PP : 1970 -1973.
- **Barnett J.A., Payne R.W. & yarrow D. 2000.** Yeasts, characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge. PP : 752-758.
- **Bennefoy C., Guillete., Leyal G., Vernebourdis E. 2002.** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaire. Doin édition, Bordeaux, pp. 101 -1 09.
- **Billon P, Sauve O. 2009.** Traite des vaches laitières. 3ème édition, France, 555 p.
- **Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79

## C

- **CNIEL.** « L'économie laitière en chiffres ». Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, **Codex Alimentarius. (2010).** Norme Codex pour le Camembert

- **Charol L., Vignola C (2002).** transformation de lait.in : Foisy L., Ratel D., Laprise A., science et Alais C. et Linden G. (1993). Biochimie alimentaire. Masson, 2<sup>ème</sup> édition paris. echnologie de lait, Québec, canada
- **Cuq J.L. (2007).** Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp: 20-25.
- **Champingny P.L. (2011).** biocompatibilité des bactéries lactiques probiotiques et d'affinage avec des mycètes du camembert isolées de laits de terroir québécois, mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'université Laval, 90 pages
- **Ctinils. (2010).** Conduite à tenir en cas de suspicion d'infection invasive à Streptococcus pyogenes (streptocoque b<sup>+</sup>ta-hémolytique du groupe A) en service de gynécologie obstétrique et maternité. Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales Sud-Est. P9. De contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol. 2. Ed. Tech. El Doc. Lavoisier et APRIA, Paris, 77-115.

## D

- **. D. Bertrand, E. Dufour,** Identification et caractérisation des microorganismes, La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, 2<sup>nd</sup> ed. Lavoisier, Paris (2006) pp. 561-581. .
- **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57
- **Deeth HC (2011)** Milk Lipids | Lipolysis and hydrolytic rancidity. In: Editor-inChief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 721-726
- **. De Souza Oliveira RP, Perego P, Converti A, De Oliveira N (2009).** Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with Streptococcus thermophilus: The effect of inulin. LWT. Food Sci. Technol. In press.
- **De Hoog, G.S., et Smith, M.T. (2011).** Chapter 31 - Galactomyces Redhead & Malloch (1977). In The Yeasts (Fifth Edition) (London: Elsevier), pp. 413-420
- **Djouadi T(2014).** Evaluation de la qualité physicochimique et microbiologique du lait cru utiliser au niveau de l'unité Danone Djurdjura Algérie. Mémoire de fin de cycle En vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie Biologique, Université Abderrahmane MIRA, Bejaia, p35
- **D.O. Loftsgaarden, C.P. Quesenberry,** A nonparametric density function, Ann. Math Statist., 36 pp. (1965) pp. 1049-1051.

- **Denis F., poly M.C., Bengen E., et. Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale, techniques usuelles. 2ème Ed. , Elsevier Masson, paris : p.417

## E

- **Eck A. et Gillis J.C. (2006).** Le fromage. 3ème Edition : Tec et Doc, Lavoisier. Paris.891p.
- **Eck A. (1987).** Le fromage. Editions : Lavoisier, TEC & DOC. Paris. 529p.
- **Eck A. (1990).** Le Fromage 3eme Edition, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris
- **Eliskases-Lechner F, Guéguen M, Panoff JM (2011)** Yeasts and Molds | Geotrichum candidum. In: Editor-in-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 765-771.
- **Engel E, Nicklaus S, Septier C, Salles C, Le Quéré JL (2001)** Evolution of the taste of a bitter Camembert cheese during ripening: characterization of a matrix effect. J Agric Food Chem 49: 2930-2939.

## F

- **FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28
- **FAO, T. W. H. O. (2001)** .Probiotic definition
- **Flicek P, Birney E (2009)** Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. Nat Methods 6: S6-S12
- **Fredote. (2005).** Connaissance des aliments –Bases aliments et nutritionnelles de la diététique .Paris, London, Newyork, Edition TEC et DOC, 397 pages
- **Forquin MP. (2010).** Étude de Brevibacterium aurantiacum, une bactérie d’affinage de fromage : de son métabolisme du soufre à son interaction avec Kluyveromyces lactis. Thèse de doctorat de Microbiologie. Institut des Sciences et Technologies Paris Tech, 224p.
- **Fernane H., (2017).** Etude des bactéries thermorésistantes dans le lait. Thèse de doctorat en science de la nature et de la vie, Université MUSTAPHA Stambouli Mascara, 14
- **Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. & Lynch, C. M. (1998).** Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. The Australian Journal of Dairy Technology 53, 83-89.

## G

- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. pp : 136-139
- **Guiraud.J.1998.**Microbiologie alimentaire.Edition : Paris

- **Guiraud.J.2012.**Microbiologie Alimentaire.Edition :paris
- **Gillis JC. (2000)** . Definitions of cheese and standardisation. In : Eck A et Gillis JC. (Eds.),cheesemaking from science to quality assurance. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp.788790.
- **Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p.
- **Guenguen M. Delepaul et Lenoir. J., (1974),** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. Lait, 66,143-175
- **Guegen L. (1979).** Cach. Nutr. Diét. 14, 213-217p.
- **Gourseaud J. 2000.** Composition de lait et potentialité technique Rév. Industrie, alimentaire et agriculture,14 pp27, 31.

#### H

- **Husson F, Krumov KN, Cases E, Cayot P, Bisakowski B, et al. (2005)** Influence of medium composition and structure on the biosynthesis of the natural flavour 1-octen-3-ol by *Penicillium camemberti*. Process Biochem 40: 1395-140

#### J

**J Dairy Sci 76: 18371844. Julien R. (2002).** Les moisissures parlons-en. Objectif prevention. 25 (4): 7-8.p

- **Jean Christian M., (2001)** Le lait pasteurisé, Groupe de recherche et d'échanges technologiques, Paris

#### K

- **Kabir A., (2015).** Contrainte de production laitière en Algérie et évaluation de la qualité de lait dans l'industrie. Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire, université Ahmad benbella, oran, p153.

#### L

- **Lafitedupont A., (2001).** Les différents laits et leurs complexités, les protéines de lait de vache aspect nutritionnel et allergie alimentaire. Thèse de doctorat en pharmacie, université de Limoges, 146p
- **Leyral G. et Vierling É. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4e édition Biosciences et techniques. 87p.
- **Lawrence R.C., Creamer L.K. et Gilles J. (1987).** Texture development during cheese ripening. J Dairy Sci 70 : 1748-1760p

- **Leclercq-Perlat M.N., Picque D., Riahi H. et Corrieu G. (2006).** Microbiological and biochemical aspects of Camembert-type cheeses depend on atmospheric composition in the ripening chamber. *J. Dairy Sci.* 89(8): 3260-3273p
- **Larpin S, Mondoloni C, Goerges S, Vernoux JP, Gueguen M, et al. (2006)** *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Res* 6: 1243-1253.
- **Le Drean G, Mounier J, Vasseur V, Arzur D, Habrylo O, et al. (2010)** Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *Int J Food Microbiol* 138: 100-107
- **Leseur R., et Melik N., (1999)** Lait de consommation In LUQUEE F.M, Laits et produits laitiers vache brebis chèvre, Tec et Doc, Lavoisier, Paris : 5 (637 pages).
- **Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Dessens C (1988)** Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food. Agric.* 44: 183-191.
- **Lenoir J. Lambert G et Schmioldt J.L., 1983.** L'élaboration d'un fromage l'exemple du Camembert. *Pour la Science*, 69, 30-42
- **Leclercq-Perlat MN, Buono F, Lambert D, Latrille E, Spinnler HE, et al. (2004)** Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *J Dairy Res* 71: 346-354

## M

- **Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. et Schuck P. (2000).** Les produits industriels laitiers. Edition : Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 178p.
- **Mallet A., Gueguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboue A., Desmasures N., 2012.** Quantitative and qualitative microbille analyses of raw milk reveals substantial diversity influenced by management practises. *Int.Dairy.Journal* (2012) ,13-21
- **Madji A. (2008).** Maitrise de la technologie fromagère et contrôle qualité des fromages AOC. Institut national agronomique de Tunisie. Ingénieur agronome.
- **Mietton B. (1995).** Incidence de la composition des fromages au démoulage et des paramètres d'environnement sur l'activité des agents de l'affinage. *Revue des ENIL*, 189, p.19-27.
- **M. Tenenhaus, L'algorithme de régression PLS1, In Tenenhaus M (ed), La régression PLS: théorie et pratique. Technip, Paris (1998) pp. 75-77.**

- **Mietton B., Desmazaud M., DE Roissart H. et Weber F. (1994).** Transformation du lait en fromage ; in “ Les Bactéries Lactiques II ”. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris
- **Majdi A., (2009).** ‘Les fromages AOP et IGP.’, in Séminaire sur les fromages AOP et IGP. INT-Ingénieur agronomie, 88p.
- **Meyer C. et Denis J.P (2004).** Elevage de la vache laitière en zone tropicale. Edition Quae, CTA, presses agronomiques de Gembloux
- **Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris.
- **Marchin S. (2007).** Dynamique de la micelle de caséines : caractérisation structurale. Thèse INRA/ Agrocampus Rennes.
- **Marcellino, N., Beuvier, E., Grappin, R., Gueguen, M., et Benson, D.R. (2001).** Diversity of Geotrichum candidum strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. Applied and environmental microbiology 67, 4752-4759
- **Makhloufi .K. M. (2012)** Caractérisation d’une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza. Thèse de doctorat de l’université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv)

#### N

- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. & Killington R. (2000).** L’essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.
- **Nehme N (2008)** Étude des interactions entre Saccharomyces cerevisiae et *Œnococcus oeni*: impact sur la réalisation de la fermentation malo-lactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de Doctorat de l’Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

#### P

- **Pearce, L. & Flint, S. (2003).** Streptococcus thermophilus. In Encyclopedia of Dairy Sciences, pp. 2577-2582. Edited by H. Roginski, J. W. Fuquay & P. F. Fox. London: Academic Press
- **Pringsulaka O., Thonggam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K. et Rangsiruji A. (2011).** Partial characterization of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food. Control : 23 : 547-551p.
- **P. Bastien, V.E. Vinzi, M. Tenenhaus,** PLS generalised linear regression, Computational Statistics & Data Analysis 48 (2005) pp. 17-46.

- **Parente E. et Cogan T. M. (2004).** Starter cultures: general aspects. In : Fox, P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T.M. et Guinee, T. P. (Eds.), Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. I. Chapman and Hall, London, 123-148p.
- **P H Garthwaite .1994,** An interpretation of partial least squares, J. Amer. Statist. Assoc. 89 (425) pp 122-127.

## R

- **Ratray FP, Eppert I (2011)** Cheese | Secondary cultures. In: Editor-in-Chief: John WF, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press. pp. 567-573
- **Roquebert M.F. 1998.** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, P: 39-95
- **Robinson R.K. (2002).** Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk products. Third edition. Edition John Wiley and sons, INC. New York.780p
- **Romain J., Thomas C, Michel M., Pierre S., Gérard B., (2008).** Laits de consommation. Les produits laitiers.3ème édition. Lavoisier, paris, p.1- 21
- **Ramet J.P. (1985).** La fromagerie et les variétés du bassin méditerrané. 187 p.
- **Ramon-Portugal F, Riba JP, Strehaiano P (1994)** Effet « killer » : analyse cinétique et modélisation. Actes Coll. 8-10.03, 549-554. Dijon SFM (Ed).

## S

- **Spinnler HE, Gripon JC (2004)** Surface mould-ripened cheeses. In: Fox PF, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Academic Press. pp. 157-174.
- **Stiles M.E. et Holzapfel W.H. (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36: 1-29p
- **ST – Gelais, D., Tirard – Collet P. (2002).** Chapitre 6 : Fromage. Dans : Vignola, C.L. (Ed.), Science et technologie du lait - Transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, Canada, 349-416p.

## T

- **Taniwaki MH, Pitt JI, Hocking AD, Fleet GH (2006)** Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. Adv Exp Med Biol 571: 49-67.

- **T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman**, The Elements of Statistical Learning, Springer-Verlag, New York, 2001.
- **Tamime A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- **U**
- **Upadhyay VK, McSweeney PLH, Magboul AAA, Fox PF (2004)** Proteolysis in cheese during ripening. In: Fox PF, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Academic Press. pp. 391-433.
- **Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. & Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. Biol. Chem. 382: 1509-1513.

#### V

- **van den Tempel T, Jakobsen M (2000)** The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. Int Dairy J 10: 263-270.
- **Veisseyre R. (1975).** Technologie du lait : Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. Edition : La maison rustique, Paris. 714p.
- **Verscheure M, Lognay G, Marlier M (2002).** Revue bibliographique: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Biotechnol Agron Soc Environ.;6:131-42.
- **Vignola C-L., (2002)** : Science et technologie du lait, transformation du lait, volume 11, 4eme édition, p67.
- **Vishniac H-S and Hempfling W-P, 1979.** Journal of General Microbiology .PP: 112:301

#### W

- **Walther B, Schmid A, Sieber R et Wehrmuller K. (2008).** Cheese in nutrition and health. Dairy Sci. Technol. 88, 389-405.
- **Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., et Smit, G. (2002).** Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal 12, 91-109.

#### Y

- **Yildiz F. (2010).** Developpement and manufacture of yougurt and other dairy products, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 435p

