

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1



**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET
DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
I.N.A.T.A-A.**

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Alimentaires

**Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel
algérien « *Bouhezza* »**

par : **Ouarda AISSAOUI ZITOUN ép. HAMAMA**

présentée le : 16 Octobre 2014

Jury composé de :

KHAROUB K.	Professeur (I.N.A.T.A-A., U. C.1, Constantine)	Présidente
ZIDOUNE M.N.	Professeur (I.N.A.T.A-A., U. C.1, Constantine)	Rapporteur
CARPINO S.	Directrice de Recherche, CoRFiLaC, Ragusa, Italie	Examinatrice
ATTIA H.	Professeur (E.N.I.S., Sfax, Tunisie)	Examineur
BENCHABANE A.	Professeur (E.N.S.A., EL Harrach, Alger)	Examineur
BENATALLAH L.	Maître de Conférences (I.N.A.T.A-A., U. C.1, Constantine)	Examinatrice

DEDICACES

Le présent travail est le fruit de plusieurs années de travail et de sacrifices,

Je le dédie à mes enfants et ma famille, en premier, et à toutes les personnes qui me sont chères.

« N'ayez pas peur d'être le premier à tailler une roche »

Remerciements

*Le travail de caractérisation sur le fromage Bouhezza a été ma première tentative de recherche de thèse de magistère. C'est par patient à ce fromage que le travail a continué. Le procédé de fabrication particulier de ce fromage lié à des pratiques anciennes a ouvert pour moi, ainsi qu'aux membres de l'équipe Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.), une multitude d'interrogations qui nous ont imposé à suivre une démarche multidisciplinaire. Cette thèse est le fruit de plusieurs années de recherche. C'est avec beaucoup d'honneur que j'exprime ici mon premier remerciement à **DIEU** de m'avoir permis d'accomplir ce travail, tous mes remerciements.*

*Pour sa confiance, ses conseils avisés et l'attention avec laquelle il a encadré et suivi l'évolution de ce travail, je tiens à remercier **Monsieur Mohammed Nasreddine ZIDOUNE**, Professeur à l'Université Constantine 1 et Chef de l'équipe T.E.P.A. du Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), et Directeur de ma thèse. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude pour m'avoir permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions.*

*J'exprime mes respectueux dévouements à **Madame KHARROUB K**, Professeur à l'INATAA, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider la commission d'examen de cette thèse.*

Mes remerciements s'adressent aux membres de jury, qui ont accepté de se déplacer, de si loin, pour nous honorer à l'I.N.A.T.A.A et faire partie du jury d'évaluation de cette thèse :

- Madame **CARPINO S.** Directrice de recherche au CoRFiLaC, Ragusa, Italie ;*
- Monsieur **ATTIA H.**, Professeur à l'E.N.I.S., et Directeur du Laboratoire d'Analyses Alimentaires, Sfax, Tunisie ;*
- Monsieur **BENCHABANE A.**, Professeur à l'E.N.S.A., Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger.*

*C'est avec un grand honneur et un grand plaisir que je remercie **Monsieur Hamadi ATTIA** de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'ENIS de Sfax, Tunisie. Je tiens également à témoigner ma profonde gratitude à Madame **Stefania CARPINO** pour son accueil au sein des laboratoires du CoRFiLaC, sa gentillesse, son intéressement à mon sujet de thèse et son implication personnelle dans cette recherche.*

Mes vifs remerciements vont à mes amies qui ont partagé avec moi mes soucis et mes joies, leur collaboration ou leur soutien moral ont contribué à la réalisation et à l'achèvement de ce travail. J'exprime également mes remerciements à l'ensemble des enseignants, techniciens et le personnel de la bibliothèque de l'INATAA.

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION

1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Fabrication des fromages	4
I.1. Principales étapes de la fabrication des fromages	4
I.1.1. Coagulation du lait	4
I.1.2. Egouttage	5
I.1.3. Salage	5
I.2. Affinage des fromages	6
I.2.1. Agents d'affinage des fromages	6
I.2.2. Microorganismes de l'affinage	7
I.2.3. Biochimie de l'affinage	8
II. Propriétés aromatiques et structurales des fromages et méthodes d'analyses	11
II.1. Profil aromatique des fromages	11
II.2. Méthodes d'analyse des arômes des fromages	12
II.2.1. Analyse sensorielle	12
II.2.2. Analyse chimique instrumentale	13
II.2.3. Combinaison des analyses instrumentales et sensorielles ou GC/MS/O	16
II.3. Propriétés rhéologiques et structurales des fromages	16
II.3.1. Méthodes d'appréciation de la texture et de la rhéologie des fromages	17
II.3.2. Méthodes d'observation de la microstructure des fromages	18
III. Terroir des fromages traditionnels et classification	20
III.1. Signification du « terroir » des fromages	20
III.2. Classification des fromages et appellations	22
IV. Situation du fromage traditionnel Algérien <i>Bouhezza</i>	24
IV.1. Terroir du fromage <i>Bouhezza</i>	25
IV.2. <i>Chekoua</i> du fromage <i>Bouhezza</i>	25
IV.3. Conditions de la fabrication traditionnelle du fromage <i>Bouhezza</i>	26

MATERIEL ET METHODES

I. Méthodologie de caractérisation du <i>Bouhezza</i>	27
II. Caractérisation par l'enquête	28
II.1. But de l'enquête	29
II.2. Population cible	29
II.3. Déroulement de l'enquête	29
II.4. Questionnaire	29

II.5. Traitement des données de l'enquête	30
III. Caractérisation expérimentale	30
III.1. Echantillons du fromage <i>Bouhezza</i>	30
III.1.1. <i>Bouhezza</i> de fermes	30
III.1.2. <i>Bouhezza</i> des fabrications contrôlées	31
III.2. Caractérisation de l'écosystème microbien et identification des bactéries lactiques	34
III.2.1. Méthodes de dénombrements des flores microbiennes	34
III.2.2. Méthodes d'identification génétique des bactéries lactiques	36
III.2.3. Méthode d'identification morphologique et biochimique des bactéries lactiques	41
III.3. Caractérisation physico-chimiques et biochimiques	44
III.3.1. Détermination du pH et de l'acidité	44
III.3.2. Détermination de la matière sèche et de l'activité de l'eau	44
III.3.3. Dosage de la matière grasse	45
III.3.4. Dosage des chlorures totaux par reste – méthode de Volhard-	45
III.3.5. Dosage de l'azote total, azote soluble et azote non protéinique	45
III.3.6. Suivi de la protéolyse par électrophorèse sur gel (UREA-PAGE)	46
III.3.7. Composition en acide gras du <i>Bouhezza</i> par CPG/SM	48
III.4. Analyse du profil aromatique	49
III.4.1. Origine et préparation des échantillons de <i>Bouhezza</i>	49
III.4.2. Extraction des composés volatiles par headspace	50
III.4.3. Analyse par le nez électronique ou SMart Nose	52
III.4.4. Analyse par CPG avec la détection de masse sélective (SPME, GC/MS)	53
III.4.5. Analyse par CPG couplée à l'Olfactométrie avec la détection de masse sélective (Purge & Trape, GC/MS/O)	54
III.5. Caractérisation de la texture et structure du fromage <i>Bouhezza</i>	55
III.5.1. Evolution de la fermeté du fromage par test de pénétration	55
III.5.2. Analyse du Profil de la Texture (TPA)	56
III.5.3. Suivi des propriétés rhéologiques du <i>Bouhezza</i>	57
III.5.4. Caractérisation de la microstructure par microscopie	58
III.6. Analyse sensorielle du fromage <i>Bouhezza</i>	61
III.6.1. Détermination des familles ou descripteurs sensorielles du <i>Bouhezza</i>	61
III.6.2. Evaluation sensorielle du fromage <i>Bouhezza</i>	62
III.7. Caractérisation de la <i>Chekoua</i> du fromage <i>Bouhezza</i>	62
III.7.1. Matériel et méthodes de confection de la <i>Chekoua</i>	63
III.7.2. Caractérisation microbiologique de la <i>Chekoua</i> et du <i>Lben</i> de rinçage	63
III.7.3. Caractérisation microscopique de la <i>Chekoua</i>	64

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractéristiques de la fromagerie de <i>Bouhezza</i> selon l'enquête	66
I.1. Description du déroulement de l'enquête	66
I.1.1. Difficultés d'accès à l'information	66
I.1.2. Collecte des échantillons de <i>Bouhezza</i> de ferme	66
I.2. Délimitation de la zone géographique de la fabrication du fromage <i>Bouhezza</i>	67
I.3. Origines des familles et étymologie de « <i>Bouhezza</i> »	69
I.4. Rôle de la femme dans la fabrication de <i>Bouhezza</i>	70
I.5. Préparation du contenant de la masse fromagère l'outre « <i>Chekoua</i> » ou « <i>Djeld</i> »	70
I.5.1. Types des peaux employées	71
I.5.2. Traitement et confection de la peau	72
I.6. Conditions de l'obtention de la pâte fromagère de <i>Bouhezza</i>	76
I.6.1. Période et durée de la fabrication de <i>Bouhezza</i>	76
I.6.2. Matières premières utilisables dans la fabrication de <i>Bouhezza</i>	77
I.7. Défauts de fabrication et mode de conservation de <i>Bouhezza</i>	79
Conclusion partielle	79
II. Caractéristiques du fromage <i>Bouhezza</i> selon l'expérimentation	81
II.1. Ecosystème microbien du fromage <i>Bouhezza</i>	81
II.1.1. Composition et évolution des groupes bactériens dans <i>Bouhezza</i>	81
II.1.2. Caractérisation des bactéries lactiques par la PCR-TTGE	83
II.1.3. Identification biochimique des bactéries lactiques	87
Conclusion partielle	91
II.2. Composition physicochimique de <i>Bouhezza</i>	92
II.2.1. Teneur en matière sèche, en matière grasse et en protéines	92
II.2.2. Le pH et la teneur en lactate et en chlorures	94
II.2.3. Classification de <i>Bouhezza</i> selon le <i>Codex Alimentarius</i>	95
II.2.4. Comparaison des échantillons par l'analyse en composantes principales	96
II.3. Protéolyse et lipolyse du fromage <i>Bouhezza</i>	99
II.3.1. Evolution des indices de maturation	99
II.3.2. Evolution de la protéolyse par UREA-PAGE	101
II.3.2. Composition en acides gras libre	105
Conclusion partielle	107
II.4. Etude du profil aromatique du fromage <i>Bouhezza</i>	108
II.4.1. Empreintes des composés aromatiques du <i>Bouhezza</i> par Smart Nose	108
II.4.2. Profil aromatique du <i>Bouhezza</i> par SPME/GC/MS	109
II.4.3. Profil aromatique du <i>Bouhezza</i> par HS/GC/MS et Olfactométrie	117
Conclusion partielle	

	121
II.5. Texture et microstructure du fromage <i>Bouhezza</i> d'expérimentation	122
II.5.1. Propriétés texturales et rhéologiques du fromage <i>Bouhezza</i>	122
II.5.2. Microstructure du fromage <i>Bouhezza</i>	126
II.5.3. Profil sensoriel de <i>Bouhezza</i>	130
Conclusion partielle	131
II. 6. Caractéristiques de la <i>Chekoua (Djeld)</i> de <i>Bouhezza</i>	132
II.6.1. Ecosystème des <i>Chekouates</i> et du <i>Lben</i> avant rinçage	132
II.6.2. Ecosystème de la <i>Chekoua</i> et du <i>Lben</i> après rinçage	133
II.6.3. Identification des bactéries de la <i>Chekoua</i> et du <i>Lben</i> par la PCR-TTGE	134
II.6.4. Observation microscopique de la <i>Chekoua</i> de <i>Bouhezza</i>	136
III. Fiche technique du fromage traditionnel <i>Bouhezza</i>	140
CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144
ANNEXES	160

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

amu : atomic mass unity

ARN : Acide Ribonucléique

ARN : Acide RiboNucléique

CMP : Caséinomacropeptide

CN : caséine native

COAs : Composés Odorants Actifs

COVs : Composés Organiques Volatiles

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

dNTP desoxyribonucléotides triphosphate

EDTA : acide Ethyl Diamine Tetra Acétique

GC : Guanine Cytosine

j : jour

MCBL : Microscope Confocal à Balayage Laser

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MEBE : Microscope Electronique à Balayage Environnementale

MGES : Pourcentage de la matière grasse (MG) dans l'Extrait sec (ES)

mM : milliMolaire

NNP : azote non protéique

PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

pb : paire de base

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDO : Protected Designations of Origin

PGI : Protected Geographical Indication

rpm : Rotation Par Minute

SN pH 4,6 : azote soluble à pH 4,6

Subsp : sous espèce

TAE : Tris Acétate EDTA

TE : Tris EDTA

TEFD : Pourcentage de la Teneur en Eau dans le Fromage Dégraissé

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine

TTGE : Temporal Temperature Gel Electrophoresis

UFC : Unité formant Colonie

Microextraction de Phase Solide (SPME)

DHS : Dynamique Head space (Espace de tête dynamique)

SHS Statique Statique head space (Espace de tête statique))

GC/MS : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

GC/O : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à l'Olfactometrie

TPA : Analyse du Profil de la Texture

Liste des figures

Synthèse bibliographique

- Figure 1** Principales mécanismes biochimiques de l'affinage
Figure 2 Roue des odeurs/arômes des fromages au lait de vache
Figure 3 Observation microscopique de quelques produits laitiers
Figure 4 Inventaire des liens possibles entre terroir et fromage

Matériel et Méthodes

- Figure 5** Etapes de la méthodologie de caractérisation du fromage *Bouhezza*
Figure 6 Diagramme adopté pour le traitement et la confection de la *Chekoua* du *Bouhezza*
Figure 7 Présentation photographiques des différentes étapes de la préparation de la *Chekoua* du *Bouhezza*
Figure 8 Diagramme simplifié de la fabrication contrôlée du fromage *Bouhezza*
Figure 9 Étapes de l'étude des bactéries lactiques du fromage par la méthode de la PCR-TTGE
Figure 10 Schématisation de la méthodologie d'isolement, de purification et d'identification biochimiques des bactéries lactiques du fromage *Bouhezza*
Figure 11 Système d'extraction dynamique de headspace (DHS) par Purge and Trap
Figure 12 Système d'extraction par headspace statique SPME
Figure 13 Système du Nez intelligent « SMartNose system »
Figure 14 Description de la détection des composants odorants par le nez humain
Olfactométrie et GC/MS
Figure 15 Principe et grandeur calculés dans l'analyse du profil de texture (TPA)
Figure 16 Etapes de préparation des échantillons en vue de l'observation sous MEB
Figure 17 *Chekoua* de *Bouhezza*. Prélèvement du biofilm (A), *Chekoua* avec du *Lben* pendant une nuit (B)

Résultats et discussion

- Figure 18** Répartition des enquêtés par wilaya selon la connaissance ou non de la pratique de *Bouhezza*
Figure 19 Répartition des enquêtés par wilaya en zones urbaines et rurales
Figure 20 Délimitation géographique de la zone de fabrication du *Bouhezza*
Figure 21 Répartition des enquêtées selon le type de peau utilisé en fabrication
Figure 22 Partage des enquêtées selon la taille de *Chekoua* utilisée
Figure 23 Diagramme traditionnel du traitement et de la préparation de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza*
Figure 24 Durée totale de la fabrication-affinage de *Bouhezza*
Figure 25 Répartition de l'utilisation du lait de vache et de chèvre par les enquêtés des différentes wilayas
Figure 26 Importance relative des groupes bactériens présents par rapport aux durées d'affinage du *Bouhezza* de ferme et d'expérimentations (n=6)
Figure 27 Profil de la PCR-TTGE de quelques échantillons de *Bouhezza* de ferme
Figure 28 Évolution du profil de la PCR-TTGE de deux fabrications simultanées du fromage *Bouhezza* (C1 et C2) durant 70j
Figure 29 Le pH et les teneurs en lactates et en chlorures du fromage *Bouhezza*
Figure 30 Paramètres de classification du fromage *Bouhezza* selon le *Codex Alimentarius*
Figure 31 Différentiation des échantillons du fromage *Bouhezza* et mise en évidence

- de la variabilité entre eux par analyse en composantes principales
- Figure 32** Evolution des indices de protéolyse dans le fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication-affinage (70j)
- Figure 33** Urée-PAGE de la fraction insoluble à pH 4,6 de *Bouhezza* de ferme
- Figure 34** Evolution du profil de la protéolyse par Urée-PAGE de la fraction insoluble à pH 4,6 des fabrications contrôlées du *Bouhezza* (C1 et C2) durant 70j.
- Figure 35** Carte de ressemblance par ACP des composés aromatiques du *Bouhezza* de ferme par SMartNose (75j F1 et F2; 150j : F3 et F4)
- Figure 36** Composés organiques volatiles responsables de la plus grande variabilité dans le *Bouhezza* de ferme
- Figure 37** Arogramm des *Bouhezza* de ferme à 75j et 120 j d'affinage
- Figure 38** Arogramm des *Bouhezza* d'expérimentation à 7j et 70 j d'affinage
- Figure 39** Changement de la fermeté du *Bouhezza* durant la fabrication par pénétrométrie
- Figure 40** Evolution du profil de la texture la pâte fromagère de *Bouhezza* durant l'affinage
- Figure 41** Courbes d'écoulement du *Lben* de fabrication
- Figure 42** Evolution des courbes d'écoulement du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication-affinage (70 j)
- Figure 43** Changement des paramètres d'écoulement en fonction de l'âge du *Bouhezza* (K et N)
- Figure 44** Evolution de la viscosité dans le fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication
- Figure 45** Observation microscopique au MEB et MEBE du *Lben*
- Figure 46** Observation au microscope électronique à balayage du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication
- Figure 47** Observations au microscope confocale du *Bouhezza* affiné
- Figure 48** Roue gout et odeur du fromage *Bouhezza* épicé et non épicé
- Figure 49** Ecosystème des *Chekouates* et du *Lben*
- Figure 50** Profil de la PCR-TTGE du gène V3 16S rRNA des échantillons : lait cru, *Lben* et *Chekoua*
- Figure 51** Micrographes du MEB de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza* avant et après une nuit de contact avec le *Lben*
- Figure 52** Micrographes du MCBL des *Chekouates* de *Bouhezza* avant contact avec *Lben*
- Figure 53** Observation au microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) des perforations de la peau de chèvre utilisé dans la fabrication de *Bouhezza*

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

- Tableau 1** Quelques composés aromatiques importants, clés et autres, dans quatre fromages
Tableau 2 Comparaison des techniques microscopiques utilisées dans le domaine des produits laitiers

Matériel et méthodes

- Tableau 3** Origine et durée d'affinage des échantillons du fromage *Bouhezza* de fermes
Tableau 4 Composition du milieu réactionnel pour la PCR (MixPCR)
Tableau 5 Composition des gels de séparation et de concentration de la TTGE
Tableau 6 Les souches utilisées comme marqueur pour la PCR-TTGE
Tableau 7 Composition des gels de polyacrylamide de l'UREA-PAGE
Tableau 8 Composition des solutions tampons des gels de concentration et de séparation

Résultats et discussion

- Tableau 9** Pratique de *Bouhezza* confirmée dans les wilayas et communes correspondantes
Tableau 10 Mois du lancement de la fabrication du fromage *Bouhezza*
Tableau 11 Bactéries se rapprochant aux différents genres et espèces des coques rencontrées dans le fromage *Bouhezza*
Tableau 12 Bactéries se rapprochant aux différents genres et espèces des bacilles lactiques rencontrées dans le fromage *Bouhezza*
Tableau 13 Composition physicochimique du fromage *Bouhezza* de ferme
Tableau 14 Composition physicochimique du fromage *Bouhezza* de fabrications contrôlées
Tableau 15. Répartition des échantillons de *Bouhezza* de fermes et d'expérimentations par analyse en composantes principales
Tableau 16 Taux de maturation (NS à pH 4,6) dans le *Bouhezza* de ferme
Tableau 17 Composition en acides gras libre de la fraction lipidique du fromage *Bouhezza* d'expérimentation
Tableau 18 Classes chimiques de composés organiques volatiles (COVs) identifiés dans le *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par SPME/GC/MS
Tableau 19 Composés volatils (valeur de la zone x 10⁶) identifiés par SPME / GC / MS dans le *Bouhezza* de ferme : Esters
Tableau 20 Les composés volatils (valeur de la zone x 10⁶) identifiés par SPME / GC / MS dans le *Bouhezza* de ferme : acides, alcools et aldéhydes
Tableau 21 Composés volatils (valeur de la zone x 10⁶) identifiés par SPME / GC / MS dans le *Bouhezza* de ferme : cétones et autres
Tableau 22 Composés aromatiques communs entre le fromage *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par SPME/GC/MS
Tableau 23 Comparaison entre le *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par GC/MS/O
Tableau 24 Changement du profil textural du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication-affinage
Tableau 24 Liste des microorganismes de référence de la PCR-TTGE de la *Chekoua*

INTRODUCTION

Introduction

Différents fromages traditionnels existent, depuis l'antiquité, dans les pays méditerranéens. Beaucoup d'entre eux sont produits dans des zones géographiques limitées et ne sont consommés localement ; d'autres, ont dépassé les limites de leurs localités et villages et même, de loin, celles de leur pays d'origine. En Algérie, au moins dix types de fromages traditionnels de différentes régions du pays sont actuellement recensés. Les plus connus sont seulement ceux portant les dénominations « *Djben* » et « *Klila* », probablement très répandus et utilisés dans l'ensemble des pays du Maghreb. Parmi les moins connus, ont été identifiés les fromages tels *Bouhezza*, *M'chouna*, et *Medghessa* dans le nord-est de l'Algérie (région des *Chaouia*), *Takemerit* et *Aoules* au sud et *Igounenes* au nord centre (région *Kabyle*).

Malgré les importantes potentialités du pays, la filière « Lait » algérienne souffre de diverses difficultés de développement et se trouve face à des défis socio-économiques très importants ; elle nécessite une attention particulière et une projection à long terme pour accroître sa production en lait cru. Cela semble, d'un côté, nécessaire pour valoriser les produits traditionnels et éviter la disparition de pratiques traditionnelles très précieuses et, certainement, plus nombreuses et diversifiées à l'origine mais, de l'autre côté, l'accroissement de la production laitière recherchée peut lui-même être favorisé par cette valorisation du patrimoine. Il n'est pas à sous-estimer que pour chaque population et chaque localité dans le monde des humains, les pratiques ancestrales ont toujours constitué un réservoir de savoir-faire utile, approprié et nécessaire, offrant des possibilités de développement socioéconomique. Nombreuses sont les traditions de notre pays qui ont dû disparaître ; celles existant encore, mais décrites que partiellement ou en attente de découverte, risquent également à suivre. Ceci est la conséquence de diverses raisons interdépendantes liées au passé, telles la longue période de colonisation, l'exode rural et la non transmission des connaissances et la non transcription de notre histoire alimentaire et/ou au présent avec le changement perçus de nos habitudes alimentaires et cette production laitière locale irrégulière et limitée, justifiant les importations de supplément pour satisfaire les besoins de la population. Cette dépendance économique de l'étranger, du lait en poudre, s'est étendue à beaucoup de dérivés, dont les fromages, ne peut aider les algériens, ni à préserver leur patrimoine, synonyme de leur identité et personnalité, ni à se développer à travers une valorisation de leurs pratiques traditionnelles.

La connaissance de notre patrimoine laitier et de tout ce qui exprime notre héritage culturel, devait, et doit toujours, être inscrite en avant des priorités de tout développement. Il est primordial et impératif pour notre pays, que tous les acteurs de l'agro-alimentaire et, en particulier, la communauté scientifique algérienne, passent au recensement et à la caractérisation rigoureuse de ces pratiques traditionnelles avec une analyse permettant de les situer par rapport à l'identité des populations et localités et aux habitudes alimentaires et de les mettre à profit selon les possibilités de la valorisation qu'elles offrent pour le développement économique.

La présente étude fait partie d'un axe de recherche de l'équipe « Transformation et Elaboration des produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) du laboratoire de recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.) sur les produits traditionnels algériens, qui œuvre à apporter sa contribution à la connaissance des produits traditionnels de la filière « Lait ». Le produit cible est un fromage traditionnel dénommé « *Bouhezza* » connu depuis très longtemps et fabriqué jusqu'à nos jours, en particulier chez les populations des « *Chaouia* ». Cette étude fait suite à une première recherche réalisée par l'équipe où une première fiche descriptive de *Bouhezza* a été établie (ZAIDI *et al.* 2000, AISSAOUI ZITOUN, 2004). Il s'agissait alors, d'une première caractérisation globale présentant le fromage et montrant la nécessité d'une investigation complémentaire et plus rigoureuse. La compréhension des phénomènes impliqués dans la fabrication de ce fromage affiné, *Bouhezza*, fait partie, en fait, de la compréhension de l'histoire de la transformation ancestrale du lait en fromage.

Les premières descriptions distinguent le produit comme un fromage affiné mais dont le procédé de fabrication semble venir défier les règles générales de la fromagerie conventionnelles. En effet, au lieu de se réaliser, distinctement, les principales phases connues en fromagerie, la fabrication de *Bouhezza* présente la particularité d'impliquer coagulation, égouttage, salage et affinage simultanément. Par ailleurs, les différentes étapes nécessaires à la fabrication ont lieu dans une outre confectionnée à partir de peau d'animaux, appelée « *Djeld* » ou « *Djeld Bouhezza* » ou « *Chekoua* » qui sert, à première vue de contenant et de media de filtrant pour l'égouttage. La pâte fromagère naissant dans le « *Djeld* » par coagulation spontanée de lait crus, fermenté ou non, et juste salée, acquiert au cours de l'affinage les caractères que nos ancêtres fromagers ont toujours su maîtriser et que nous nous devons étudier. Les caractères physicochimiques évoluant depuis la matière première au produit fini, la transformation en fromage s'installe par le biais de processus

biochimiques faisant intervenir l'action d'enzymes et de microorganismes indigènes qui ont à travailler en harmonie avec tout un écosystème dépendant des conditions d'affinage, de la composition de la matière première, de la flore initiale de cette dernière et de celle que le contenant de la masse fromagère, ici, la peau animale, pourrait y introduire.

Les questions auxquelles nous nous sommes confrontées pour arriver à situer ces pratiques traditionnelles et accéder à la compréhension des phénomènes impliqués dans l'accomplissement de l'affinage sont nombreuses et font appels aux divers aspects habituellement explorés par les spécialistes en fromages. Tout d'abord, il y a nécessité d'approcher les populations concernées, les délimiter géographiquement et collecter le maximum d'éléments d'informations sur ce savoir-faire, depuis la matière première, aux ustensiles et méthodes de préparation utilisés jusqu'au produit fini, son emploi et son mode de conservation, sans rien négliger des habitudes alimentaires selon chaque localité. Cela est approché dans notre étude par le biais d'une enquête sur terrain auprès des familles qui fabriquent et/ou consomment le fromage *Bouhezza*. Le rapprochement de ces familles nous permet aussi de nous procurer des échantillons de fromage de ferme à caractériser et servent de références de comparaison. En complément à ce travail de terrain indispensable, et après déduction des informations décrivant le ou les diagramme(s) de fabrication et les paramètres inhérentes à sa réussite, des productions en laboratoire sont envisagées puis vérifiées par confrontation des fromages obtenus à ceux provenant de fermiers à travers divers analyses physicochimiques, microbiologiques et sensorielles. Il est aussi donné une importance à la détermination du rôle de la peau dans la fabrication de ce fromage affiné.

Notre caractérisation du fromage *Bouhezza* projette d'acquérir, en plus, de la connaissance de son diagramme de fabrication, de sa composition et de ses caractères sensoriels et organoleptiques, différents autres aspects dont la description des composants principales de son écosystème, telles les bactéries lactiques (évolution et identification), l'évolution des phénomènes de digestion (glycolyse, protéolyse et lipolyse) et les répercussions attendues aux niveau profil aromatique et microstructure. Afin, de pouvoir le situer correctement par rapport aux classifications, en usage, des fromages du monde ; l'établissement d'une fiche technique descriptive détaillée de *Bouhezza* est indispensable.

Le document présenté est structuré en **(1) Données bibliographiques** sur les fromages et le *Bouhezza*, **(2) Matériel et les méthodes** décrivant toutes les techniques de caractérisation de *Bouhezza*, et **(3) Résultats et discussion** regroupant les caractéristiques du fromage *Bouhezza*, collecté ou fabriqué, ainsi que ceux de la *Chekoua*.

DONNEES

BIBLIOGRAPHIQUES

I. Fabrication des fromages

I.1. Principales étapes de la fabrication des fromages

La fabrication fromagère peut être considérée comme un phénomène d'agglomération, correspondant à une synérèse, associée à un phénomène d'écoulement. Il s'agit de l'agglomération des éléments protéiques du lait, de la caséine principalement, plus ou moins modifiées, qui emprisonnent les autres constituants et, ensuite, de l'agglomération de morceaux de caillé moulés. Ce phénomène d'agglomération est associé à celui d'un écoulement de la phase liquide, composée de l'eau du lait et des éléments solubles emprisonnée dans des pores, puis libérée (LUQUET, 1990).

Habituellement la fabrication du fromage comprend trois étapes : La formation d'un gel de caséines, c'est la coagulation du lait ; la déshydratation partielle du gel, c'est l'égouttage qui aboutit à un caillé et le salage. Ces étapes concernent les fromages frais. Le reste des fromages subissent en plus une étape d'affinage, ce sont les fromages affinés (Camembert, Roquefort, Gouda, Tulum,...).

I.1.1. Coagulation du lait

La coagulation du lait résulte de l'association des micelles de caséine plus au moins modifiées. Cette agglomération mène à la formation d'un coagulum dont le volume est égal à celui du lait mis en œuvre. Ces modifications physico-chimiques des caséines sont induites soit par acidification soit par action d'enzymes coagulantes (GASTALDI-BOUABID, 1994).

L'acidification du lait peut être obtenue par les produits de fermentation de bactéries acidifiantes ou par des composés chimiques d'action acidifiante directe ou indirecte. La diminution concomitante du pH a pour effet de faire régresser l'ionisation des fonctions acides des caséines induisant le déplacement progressif du calcium et du phosphate inorganique de la micelle vers la phase aqueuse. Ceci induit la désorganisation des micelles et une réorganisation des sous unités micellaires (BRULE *et al.*, 1997). L'acidification microbienne du lait est un processus progressif, lent et uniforme. Il est caractérisé par des difficultés liées à la maîtrise du développement microbien (cinétique de multiplication, état physiologique, facteurs de croissance, produits de métabolismes et autres). Le coagulum édifié est un ensemble de flocons caséiniques emboîtés les uns sur les autres (ATTIA *et al.*, 2000). Le taux et l'importance de l'acidification influencent la

texture du gel en contrôlant son taux de déminéralisation (Mc SWEENY *et al.*, 2004). Le gel acide obtenu est friable, lisse et homogène.

Dans la coagulation enzymatiques, plusieurs enzymes protéolytiques d'origine animale (veau, taurillons, porc et poulets), végétale (artichaut, chardon) et microbienne (*Kluyvermyces*, *Mucor miehi*, *Mucorpusills* et *Endothia parasitica*) sont utilisés (DALGEISH, 1982 ; RAMET, 1985 ; RAMET, 1987 et ALAIS et LINDEN 1997). L'enzyme la plus fréquente en fromagerie est la présure, secrétée dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait. Son mécanisme d'action fait apparaître trois étapes (ALAIS et LINDEN, 1997 ; BRULE *et al.*, 1997) : hydrolyse enzymatique de la liaison peptidique phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ , ensuite agrégation des micelles de caséines déstabilisées et puis développement d'un réseau par réticulation et formation d'un gel. Les gels obtenus sont élastiques et peu friables. Leur raffermissement est rapide et important par rapport au gel lactique. Leur porosité est bonne, mais leur imperméabilité est forte (RAMET, 1985).

I.1.2. Egouttage

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH et a_w) et chimique du caillé et par conséquent l'affinage du fromage (WEBER, 1997).

Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécanique et thermique, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matière grasse) (RAMET 1986 et 1997).

I.1.3. Salage

En fromagerie, le salage est une phase indispensable de la fabrication des produits affinés. La teneur en sel des fromages varie selon le type de fromage, en moyenne elle est de 0,5-2 g/100 g dans la plupart des fromages, dans certains cas (les fromages bleus et quelques fromages de chèvres), elle peut s'élever à 3-4 g/100g. Par contre, certains fromages orientaux conservés en saumure ont des teneurs assez élevées (8-15 g/100 g). Les modalités de salage sont par saumurages (Emmental, et Camembert), salage à sec et salage en masse (ALAIS et LINDEN, 1997). Le salage en masse est utilisé dans les fabrications traditionnelles de quelques fromages typiques du bassin méditerrané. Il permet la

préservation du lait, prolonge les phases de coagulation et d'égouttage du fromage (RAMET, 1986).

Le sel permet d'atteindre l'humidité appropriée du fromage (PONCE DE LEON GONGALEZ *et al.*, 2000). Il exerce, selon sa concentration, une action microbienne sélective et un effet inhibiteur sur l'activité des enzymes. A titre d'exemple, la croissance des bactéries lactiques des levains est inhibée à une teneur en sel supérieure à 2,5 g/100 g, est pratiquement nulle au-dessus de 5 g/100 g. *P.roqueforti* subit une inhibition de la germination des spores pour des taux de 3-6 g/100 g. L'effet du sel sur le développement de la flore microbienne des fromages ne peut toutefois être apprécié pleinement qu'en tenant compte de la tolérance des microorganismes au sel dans le milieu fromage et de la teneur en sel de la pâte fromagère (CHOISY *et al.*, 1997 b).

I.2. Affinage des fromages

L'affinage est l'étape la plus complexe de la fabrication des fromages maturés qui dépend de chaque caractéristique physico-chimique ou microbiologique du fromage (BENNETT et JOHNSTON, 2004). C'est un processus biochimique complexe et long qui correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé par les différents agents (JEANTET *et al.*, 2008). Le fromage devient donc le siège de différentes dégradations qui s'effectuent simultanément ou successivement aboutissant à la libération de substances sapides et odorantes en même temps que la modification de la texture (CHOISY *et al.*, 1997 a). Le fromage est ainsi comparé à un bioréacteur complexe dont le praticien devra maîtriser l'évolution pour la porter vers les caractéristiques optimales recherchées (RAMET, 1997). La durée d'affinage varie selon le fromage, elle dure quelques semaines à deux ans ou plus à des températures spécifiques pour les différents types de fromages (FOX *et al.*, 1994).

I.2.1. Agents d'affinage des fromages

Les agents responsables de l'affinage des fromages sont les enzymes. Selon FOX *et al.* (1993) quatre ou éventuellement cinq agents sont impliqués dans la maturation des fromages :

- (1) la présure ou substitut de présure (la pepsine ou protéases microbiennes) ;
- (2) les enzymes indigènes du lait, très importants dans les fromages au lait cru ;
- (3) les ferments lactiques et leurs enzymes, qui sont libérés après que les cellules sont mortes et lysées ;

(4) les enzymes des ferments secondaires (par exemple des bactéries propionique, *Brevibacterium linens*, les levures et les moisissures, comme *Penicillium roqueforti* et *P.candidum*) sont très importantes dans certaines variétés de fromage;

(5) les autres bactéries outre que ceux des ferments (NSLAB), c'est à dire les microorganismes qui ont survi suite à la pasteurisation du lait de fromagerie ou contaminant le lait ou le caillé après. Ces microorganismes après mort et lyse agissent avec leurs enzymes libérés dans le fromage.

I.2.2.Microorganismes de l'affinage

Le fromage est le siège d'un développement important de microorganismes. Ces microorganismes appartiennent à des groupes ou des espèces très diverses et sont originaires de plusieurs sources : le lait, les levains, le sel ou les saumures, le matériel de la fromagerie, l'atmosphère des locaux... (CHOISY *et al.* 1997b). Chaque type de fromage est cependant caractérisé par une microflore et des équilibres microbiens qui lui sont propres. La diversité de la flore et son évolution au cours de l'affinage contribuent à la complexité du processus et rendent ainsi son étude très difficile. Selon BERESFORD *et al.* (2001), l'objectif de l'étude de la microbiologie des fromages est de développer une vision claire de la microflore et de son évolution. Il est important de surveiller la flore totale ainsi qu'identifier et caractériser les composants individuels. Les techniques disponibles pour l'étude de la microbiologie des fromages peuvent être divisés en trois groupes : (1) les méthodes qui dépendent de la culture suivie par la caractérisation phénotypique ; (2) méthodes qui dépendent de la culture suivie par caractérisation moléculaire ; et (3) des procédés qui dépendront seulement de la caractérisation moléculaire.

Les deux catégories des microorganismes des fromages sont la flore des ferments lactiques et la flore secondaire. Les bactéries des ferments lactiques sont impliquées à la fois dans l'acidification et dans la maturation des fromages alors que la flore secondaire est principalement impliquée dans l'affinage. Cette dernière regroupe les bactéries lactiques originaires désignées par NSLAB (Non-Starters Lactic Acid Bacteria) et les autres bactéries (bactéries de surface et bactéries propénoïques), les levures et/ ou les moisissures (BERESFORD *et al.*, 2001). Les équilibres entre les différents groupes microbiens et, par suite, l'importance relative des populations, peuvent être fortement modifiés; certaines espèces ou certains groupes se multiplient activement alors que d'autres tendent peu à peu à disparaître. Ainsi un groupe microbien resté inactif peut à un moment donné de l'affinage

jouer un rôle déterminant grâce à l'évolution du substrat (CHOISY *et al.*, 1997 b). Dans le fromage Parmigiano Reggiano, cette flore qui est initialement d'une charge de 10^2 ufc/g atteint 10^6 - 10^7 ufc/g après 3 à 9 mois d'affinage et devient la flore dominante (GATTI *et al.*, 2008).

Concernant les bactéries lactiques, il apparaît clairement qu'elle joue, par leurs propriétés acidifiantes et protéolytiques, un rôle fondamental dans les processus de transformation du lait en caillé et du caillé en fromage affiné. La dégradation des protéines constitue le phénomène majeur de l'affinage puisqu'elle améliore la texture et la digestibilité du caillé (URBACH, 1995 ; WIDYASTUTI *et al.*, 2014). De plus, par les peptides et les acides aminés produits, elle participe au développement de la saveur et de l'arôme ou des précurseurs d'arômes des fromages affinés (COKER *et al.*, 2005, GOBETTI *et al.*, 2007,). Selon GARABAL (2007), les bactéries majeurs de cette flore comprennent des souches, plus ou moins, acidifiantes telles que *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, et *Enterococcus spp.*, ainsi que quelques espèces de lactobacilles NSLAB (*Leuconostoc spp.*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius*, et *Lb. rhamnosus*). Entre autres les études sur différents types de fromages au lait cru montrent une grande diversité de LAB selon les genres et les espèces vue leur capacité à croître dans des environnements pauvres en sucre et hostiles (SETTANNI et MOSCHETTI, 2010).

I.2.3. Biochimie de l'affinage

La biochimie de l'affinage peut être subdivisée en processus primaires et processus secondaires de dégradation. Le processus primaire comporte : la fermentation du lactose résiduel, de l'acide lactique et de l'acide citrique, ainsi que la dégradation des protéines et des lipides. Suite à ces événements primaires, d'autres événements biochimiques secondaires prennent place et sont très importants pour le développement des composés aromatiques. Le processus secondaire concerne donc la dégradation des acides aminés et des acides gras (Mc SWEENEY, 2004). La figure 1 rassemble les principales réactions enzymatiques de l'affinage des fromages.

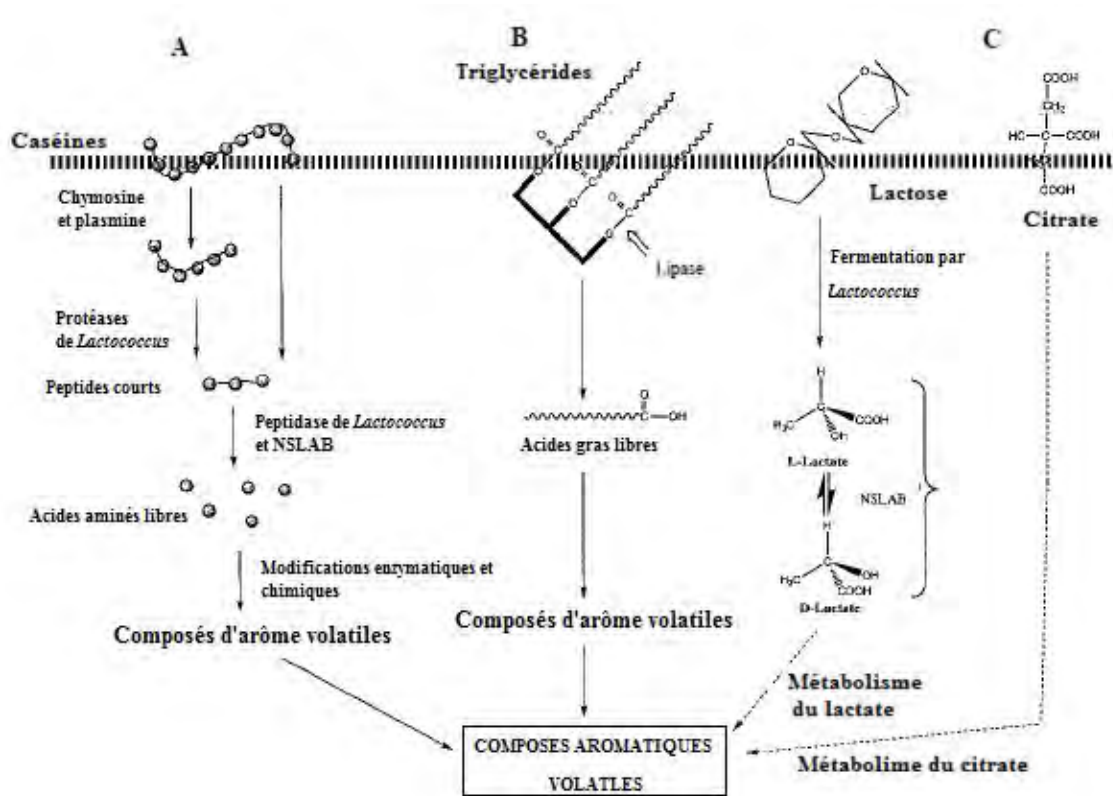


Figure 1 : Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage

Protéolyse(A), lipolyse (B) métabolisme de lactose, de lactate et de citrate (C) (traduit de MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

I.2.3.1. Fermentation du lactose

L'acide lactique, produit de dégradation du lactose par les microorganismes est un substrat de plusieurs réactions de l'affinage des fromages. Les bactéries lactiques vraies produisent l'acide lactique presque pur, sans gaz selon la voie de Meyerhoh-Embden (ALAIS et LINDEN, 1997). Les lactocoques sont souvent choisies pour leur capacité acidifiante rapide (ATLAN *et al.*, 2000). L'acide lactique subit d'autres fermentations produisant l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide butyrique et le CO₂. Ces produits peuvent être transformés en composants de flaveur comme les aldéhydes et les cétones (Mc SWEENEY, 2004).

I.2.3.2. Protéolyse

La protéolyse apparaît comme l'un des phénomènes majeurs pendant l'affinage des fromages et c'est le plus complexe (Mc SWEENEY, 2004). Elle contribue à la texture des pâtes, au goût, à l'ouverture et au croustilage par dégradation biochimique des protéines (COURROYE, 1987). Cette dégradation est réalisée par les systèmes enzymatiques des

microorganismes, des enzymes coagulantes et des enzymes du lait. L'importance de la protéolyse peut être très limitée comme dans le cas du fromage mozzarella, à très importante, cas des fromages bleu moisissés.

L'activité des enzymes naturelles du lait telles que la plasmine et la cathepsine D est très limitée dans les fromages. La plasmine a un pH optimum d'action de 7,5 et agit sur la caséine β . L'action de la cathepsine D sur les caséines est très similaire à celle de la chymosine et son pH optimum est d'environ 4,00 (FOX *et al.*, 1994). La succession de la dégradation des caséines en polypeptides puis en acides aminés est rencontrée surtout dans les fromages à pâtes pressées et à flore essentiellement lactique (CHOISY *et al.*, 1997a). La protéolyse du Cheddar par la mesure de l'azote soluble à pH 4,6 par rapport à l'azote total (NS pH 4,6) montre qu'elle est surtout due aux enzymes coagulantes (pepsine ou chymosine). Le même phénomène est rencontré dans le Gouda (O'KEEFFE, 1978 ; FOX *et al.*, 1994). Selon CHAMBA (2000), le degré de protéolyse qui est défini (NT) varie de 23,5 à 25 % dans l'Emmental. En fin d'affinage du Camembert au lait cru le taux de protéolyse est de 35 % (LENOIR, 1962). Le degré de protéolyse des fromages des types saint Paulin et Comté peut atteindre respectivement 18 et 30 % (CHOISY *et al.*, 1997 a).

Par ailleurs, l'activité protéolytique des microorganismes est variable. Les enzymes mis en jeu sont des endopeptidases et des exopeptidases. En effet, la dégradation des protéines extracellulaires grâce aux protéases membranaires des lactobacilles et lactocoques assure les besoins en acides aminés de ces germes (ATLAN *et al.*, 2000).

I.2.3.3. Lipolyse

La lipolyse est un phénomène limité qui participe positivement à l'élaboration des qualités gustatives des fromages. Les enzymes lipolytiques dans les fromages proviennent du lait, de la présure et des microorganismes. Le lait contient une lipase lipoprotéique (LPL) qui reste assez active dans les fromages au lait cru. D'autre part plusieurs microorganismes peuvent intervenir dans la lipolyse des fromages comme principalement les moisissures et les microcoques (ALAIS et LINDEN, 1997). Les bactéries lactiques sont dotées d'endolipases qui agissent dans les fromages après lyses des cellules (Mc SWENEEY, 2004). Les changements dans la saveur et l'arôme des fromages sont attribués à la lipolyse selon la teneur en acides gras libérés (COKER *et al.*, 2005). Il faut noter qu'un taux de lipolyse élevé induit l'apparition de goût de rance et de savon dans le fromage (CHILLIARD et LAMBERET, 1987).

Suite à l'ensemble des réactions de dégradation des constituants du caillé, différentes modifications apparaissent dans le fromage affectant directement ses propriétés organoleptiques dont principalement l'arôme et la texture. Dans ce qui suit nous donnerons un aperçu sur les propriétés microbiologiques, aromatiques et texturales des fromages et les méthodes d'approches de ces derniers.

II. Propriétés aromatiques et structurales des fromages et méthodes d'analyses

II.1. Profil aromatique des fromages

Le profil aromatique des fromages est le résultat de l'association de plusieurs composés volatiles. Ces composés appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : il y a des hydrocarbures, des composés possédant un ou plusieurs groupements fonctionnels telles que acides, alcools primaires et secondaires, composés carbonylés, esters produits soufrés amines, des heterocycles azotés, lactones et des hydrocarbures (SPINLER *et al.*; 1997). A titre d'exemple MALLIA *et al.* (2005) ont identifiés entre 61 et 86 composés dans la fraction aromatiques de différents fromages traditionnels d'appellation d'origine protégée (Gruyère, Ragusano, Manchego) PDO respectivement par les méthodes « espace de tête, headspace » et SPME (MicroExtraction en Phase Solide). VARMING *et al.* (2013) ont identifié 98 composés volatiles dans l'arôme de quelques fromages affinés Danois. Vue la diversité de ces constituant il est difficile de définir la contribution apporté par une molécule donnée ou par une classe de molécules dans la formation de l'arôme globale (SPINLER *et al.*, 1997). C'est seulement après utilisation de l'olfactométrie que les chercheurs ont pu attribuer pour certaines de ces molécules une note particulière et donc une perception aromatique précise. En effet la classe chimique des esters a été responsable des notes florales et fruité dans les fromages (HORNE *et al.*, 2005). Les acides gras butanoïque et hexnoïques ont été liés à des notes de rance/chaussette sale et de sueur respectivement (CARPINO *et al.*, 2004 ; HORNE *et al.*, 2005 ; POVEDA *et al.*, 2008).

Les composés d'arômes sont originaires des voies métaboliques se développant durant l'affinage sous l'action de différentes enzymes (MOLIMARD et SPINLER, 1995, LARRAYOZ *et al.*, 2001). SMIT *et al.* (2005) regroupent dans le tableau suivant (Tab. 1) un exemple de ces composés rencontrés dans quelques fromages affinés.

Tableau 01. Quelques composés aromatiques importants, clés et autres, dans quatre fromages (SMIT *et al.*, 2005)

Métabolisme	Gouda	Cheddar	Camembert	Type-Swiss
Acides aminés	3-Methylbutanal	3-Methylbutanal	3-Methylbutyrate	Methional
	3-Methylbutanol	Acide isovalérique	3-Methylbutanal	3-Methylbutanal
	Methanethiol	Methional	Methional	Scatole (3-méthylindole)
	Dimethylsulphide	Methanethiol	Methanethiol	
	2-Methylpropanol	Dimethyldisulphide	Dimethylsulphide	
	Dimethyltrisulphide	Dimethyltrisulphide	Benzaldehyde	
			Phenylacetaldehyde	
Sucres	Diacetyl	Acide propionique	2,3-Butanedione	Acide propionique
		Diacetyl		Diacetyl
Lipides	Acide butyrique	Ethyle hexanoate	1-Octen-3-ol	Ethyl butyrate
	Butanon		Acidebutyrique	Ethyl hexanoate
	Hexanal		1-Octen-3-one	Ethyl-3-methylbutanoate
	Pentanal		2-Undecalactone	Phenylethylacetate
			γ -Decalactone	
Voies conjuguées et autres	Ethyle butyrate		Acétate de phényle	
	Limonène		éthyle	

Le développement des caractéristiques spécifiques de chaque type de fromage est donc le résultat des réactions complexes de l'affinage et de la présence de différents composés chimique (ANDIÇ *et al.*, 2015).

II.2. Méthodes d'analyse des arômes des fromages

L'analyse des arômes des fromages, comme tout autre aliment, est basée sur des méthodes sensorielles et des méthodes chimiques instrumentales.

II.2.1. Analyse sensorielle

Par définition l'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes de sens. Les caractéristiques organoleptiques des fromages comportent : l'apparence, la texture, et l'ensemble des sensations olfacto-gustatives (soit les odeurs, les arômes, les saveurs et les sensations trigéminales). L'aspect d'un fromage, sa couleur, son odeur, sa consistance, sa saveur, son arôme stimulant les sens ; de la vue, de l'ouï, du toucher, de l'odorat et du goût et provoquant des réactions plus ou moins vives d'acceptation ou de rejet. Ce sont ces différentes propriétés des fromages qui ont été discutées pour une meilleure approche de la classification des

fromages par CHAMBERS *et al.* (2005) ; d'autre part BERODIER *et al.*, (2003) propose un guide d'évaluation des différentes perceptions liées à l'odeur et l'arôme des fromages à pâte dure et semi-dure. Il en résulte 75 descripteurs appartenant aux familles suivantes : lactique, végétal, floral, fruité, torréfié, animal, épicé et autres qui sont présentés sous forme de roue en figure 2.

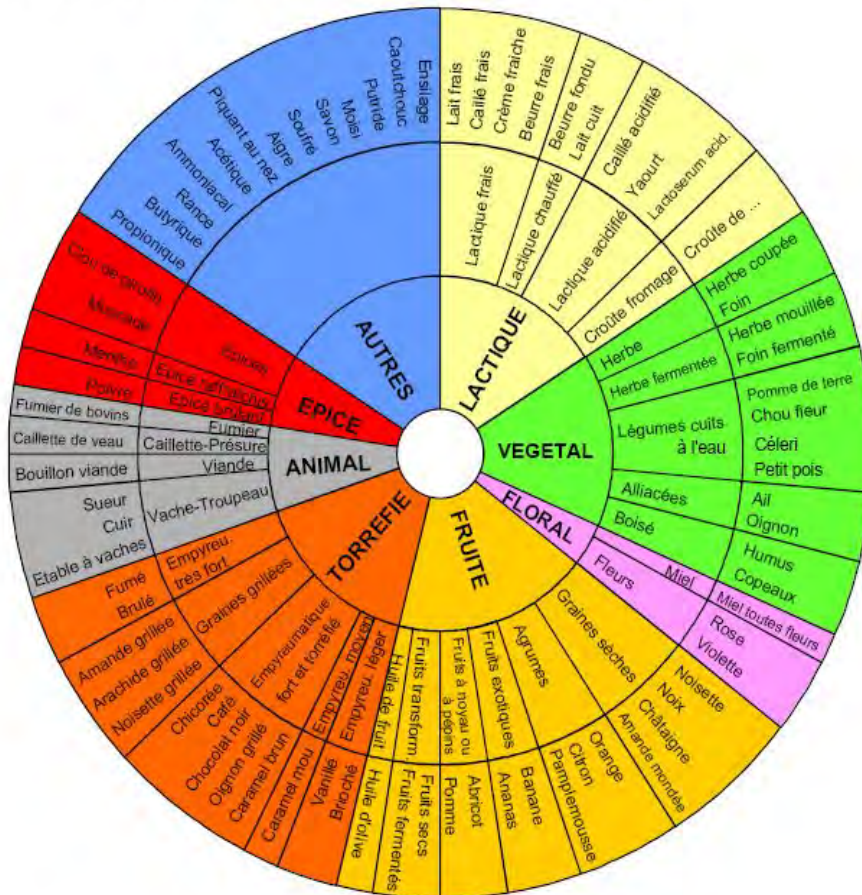


Figure 2 : Roue des odeurs/arômes des fromages au lait de vache
(BERODIER *et al.*, 2003)

En complément et selon l'étude de BÂRCENAS *et al.* (2005), l'analyse sensorielle est un outil important qui permet la différenciation de fromages de différents laits et principalement ceux d'appellation protégées. Elle peut être un moyen de classification des fromages.

II.2.2. Analyse chimique instrumentale

L'analyse instrumentale des composés aromatiques nécessite l'extraction, la concentration et l'injection des composés de l'arôme en vue de leur analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Plusieurs techniques d'extraction et de

concentration ont été citées dans la littérature. En outre des méthodes classiques d'extraction par solvant et par entraînement à la vapeur d'eau, il y a la méthode de "Head Space" espace de tête ou d'effluves avec ses différentes variantes.

Dans ce qui suit, nous décrivons quelques méthodes d'extraction des arômes basées sur le principe de Head Space. Parmi les variantes de cette méthode il existe l'analyse de l'espace de tête statique désigné par Smart Nose et SPME (MicroExtraction en Phase Solide) et aussi l'analyse de l'espace de tête dynamique par le système Purge and Trap (P&T). La méthode de SPME est une des techniques classiques d'injection, et elle a souvent été utilisée dans l'étude du profil aromatique des fromages (LARRAYOZ *et al.*, 2001, MALLIAA *et al.*, 2005).

II.2.2.1. Extraction et pré-concentration par « Head Space »

La méthode de headspace **ou espace de tête** est la méthode la plus simple et la moins critiquable. Son principe consiste à analyser la phase gazeuse en équilibre avec l'échantillon de fromage placé en atmosphère confinée (RICHARD et MULTON, 1992). Cependant, l'injection d'un grand volume gazeux à la pression atmosphérique dans la colonne chromatographique en sa pression étant un problème délicat palier par une pré-concentration de l'échantillon. Cette pré-concentration peut être effectuée de différentes façons :

- a. les constituants de l'arôme sont piégés sous forme liquide ou solide dans une boucle d'échantillonnage refroidie à basse température.
- b. Les constituants volatils sont piégés sur un adsorbant solide, qui se comporte comme un support chromatographique, constitué par un polymère organique hydrophobe à très grande surface spécifique. Les plus utilisés dans l'isolement des composés volatils sont : le charbon actif, les chromosorbs 102 et 105, porpack et tenax GC (RICHARD et MULTON, 1992).
- c. Les composés volatils entraînés par un courant gazeux sont piégés dans une colonne de grande longueur dont la paroi interne est enduite d'une phase organique (exp. l'huile de silice), ils seront ensuite désorbés par chauffage et recondensés dans un piège.
- d. La dernière technique consiste à entraîner les composés volatils par un courant gazeux inerte (azote, argon, hélium, gaz carbonique) et à les piéger dans une boucle refroidie dans l'azote liquide, cas de la technique de Purge and Trap.

Toutes ces méthodes de « head-space » se prêtent bien à des analyses rapides et ont l'intérêt de n'exiger qu'un matériel simple et relativement peu coûteux, elles ne peuvent malheureusement être utilisées, la plupart du temps, que pour des aliments pour lesquels les molécules les plus importantes du point de vue de l'arôme, sont peu retenues par la matrice protéique, ou glucidique, part H₂O (molécules polaire) et par les liquides (molécule apolaires). Les arômes analysés par ces différentes méthodes sont bien représentatifs de l'odeur du produit (RICHARD et MULTON, 1992).

II.2.2.2. Méthodes de fractionnement par Chromatographie en phase gazeuse « CPG »

A l'aide de la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), les mélanges très complexes des substances volatils peuvent être séparés, identifiés et quantifiés dans un temps relativement court. La technique offre l'avantage de sa rapidité de séparation, sa précision et son efficacité (RICHARD et MULTON, 1992). Son principe est la distribution des solutions entre une phase stationnaire (liquide ou solide) et une phase mobile (gazeuse), durant leur passage à travers la colonne. Les molécules du mélange introduit restent en partie dans la phase mobile et dans la phase stationnaire suivant les règles physico-chimique de partition (gaz-liquide) ou d'adsorption (gaz-solide) (RICHARD et MULTON, 1992). Il en résulte un temps de rétention spécifique pour chacun des composants du mélange injecté. Ce temps est mesurable, enregistré et permet de fournir les différents pics du chromatogramme, selon les conditions choisies pour l'analyse, chaque pic caractérise qualitativement/quantitativement une substance individuelle (RICHARD et MULTON, 1992).

II.2.2.3. Méthodes d'identification par Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse couplée à la CPG, s'est révélée un des outils les plus précieux dans l'analyse des arômes. Elle peut être utilisée pour identifier les constituants des arômes, pour les doser spécifiquement et même dans certains cas, pour vérifier leur origine, grâce à leur teneur en carbone 13 (RICHARD et MULTON, 1992).

L'ionisation des composés est le plus souvent réalisée par impacte électronique à 70 eV. Les spectres enregistrés sont comparés à ceux des produits de référence (MULTON, 1991).

II.2.2.4. Analyse par la méthode de Smart Nose

L'analyse des composants aromatiques d'échantillons solides ou liquides par le système de « SmartNose ou Nez Intelligent, nez électronique » permet l'analyse directe des composés organiques volatils par un spectrophotomètre de masse (MS) sans séparation des

constituants de l'espace de tête. C'est une nouvelle méthode de pré-concentration des substances organiques volatiles. Elle a été utilisée pour détecter des différences dans le profil aromatique de fromages traditionnels (CARPINO *et al.*, 2008).

Le système de Smart Nose désigné par le système **INDEX** (pour **I**nside **N**eedle**D**ynamic**E**xtraction : extraction dynamique dans une aiguille) consiste en une seringue dont l'aiguille est garnie d'une phase adsorbante sous forme de particules Tenax® ou "Silox" (un polymère de type siloxane exclusif chez SMartNose). La désorption est thermique (en expulsant un peu de gaz ou d'air). Ce système travail automatiquement ou manuellement. Le mode manuel permet un chargement direct de l'adsorbant de l'espace de tête de l'échantillon puis l'aiguille est placée dans le port d'injection de la CPG.

En denier, il faut noter que la technique du Nez Intelligent est moins puissante que l'analyse instrumentale couplée à l'olfactométrie (GC / O). En effet, le nez humain est un détecteur beaucoup plus sensible, sa limite de détection est de moins de 10 à 19 moles pour certains odorants (REINECCIUS, 1994). Les deux techniques sont donc complémentaires et permettent de caractériser le profil volatile de différents échantillons.

II.2.3. Combinaison des analyses instrumentales et sensorielles ou GC/MS/O

Le développement dans la recherche des constituants d'arômes et des perceptions olfactives de chacun d'entre eux a permis la mise au point de techniques qui combinent d'une part l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et d'autre part l'olfactométrie en utilisant le nez humain ou le nez artificiel (CURIONI et BOSSET, 2002).

II.3. Propriétés rhéologique et structurales des fromages

Le rhéologie, du grec « rhé », couler, est la branche de la physique qui étudie la déformation et l'écoulement de la matière (DOHMERS, 1995). La rhéologie alimentaire est une extension de cette notion aux produits alimentaires (ROUDOT, 2002). Anciennement DAVIS (1937) selon ROUDOT, (2002) a décrit la consistance d'un fromage à partir d'un ensemble des paramètres rhéologiques de sens physique précis : module d'élasticité, viscosité et temps de relaxation. De son étude réalisée sur divers fromages, il conclue, qu'en générale, le fromage est un corps viscoplastoélastique, car lorsqu'il est soumis à une contrainte (pression, pénétration, cisaillement, etc.), il présente une combinaison de déformation élémentaire relevant de l'élasticité, de la viscosité et de la plasticité. Ce comportement peut être différent d'un fromage à un autre selon l'importance

et le type de contrainte imposée. De ce fait, on peut dire que chaque fromage, à un instant donné de son affinage, constitue une entité rhéologique et que de nombreux paramètres sont susceptibles de modifier son comportement (HARDY et SCHER, 1997).

D'autre part, la microstructure des fromages rassemble les informations de l'observation de la structure de la surface des fromages visualisant ainsi l'arrangement des différentes macromolécules soit principalement les protéines (aspect, taille, agencement des caséines) et les lipides (leur taille et dispersion). Plusieurs études ont été réalisées sur les fromages ou les gels lactiques en utilisant différents types de microscopes (KALAB, 1979 ; MARCHESSEAU *et al.*, 1997 ; De FREITAS, 2005 ; ROVIRA *et al.*, 2011, ONG *et al.*, 2011). Pour les fromages, la microstructure se différencie selon le type du fromage et la technologie de fabrication. Il a été prouvé que la microstructure des fromages peut être influencé par différents facteurs liés aux lait ou au procédé de fabrication des fromages (les pressions et températures élevées du traitement du lait, les enzymes de coagulation, bactéries d'affinage...) (GASTALDI *et al.*, 1996, PEREIRA *et al.*, 2009 ; AUTY *et al.*, 2011).

II.3.1. Méthodes d'appréciation de la texture et de la rhéologie des fromages

L'étude de la relation entre la composition et la structure d'un aliment nécessite des étapes successives soit : composition → structure → propriétés mécaniques (rhéologie) → texture → qualité organoleptique. De ce fait la mesure des propriétés mécaniques fondamentales est surtout essentielle pour la compréhension de la structure de l'aliment alors que les mesures texturales sont utiles pour quantifier la qualité organoleptique (HARDY et SCHER, 1997).

Dans la rhéologie fondamentale les techniques sont basées sur l'application d'une contrainte sur un échantillon et observation du comportement ou déformation de ce dernier en fonction du temps. Cependant les caractéristiques texturales des fromages sont mesurées aux moyens de tests empiriques simples comme les méthodes de la pénétration et aussi aux tests imitatifs de la mastication. Ces dernières méthodes visent à reproduire de manière partielle le processus de mastication. Différents équipements sont proposés pour définir « Profil de la Texture » des fromages, permettant de décrire à partir d'un seul test un ensemble de paramètres texturaux pouvant être reliés à des caractéristiques sensorielles (BOURNE, 2002). Ce test a permis de comparer des échantillons de fromages soumis à des conditions identiques (AWAD, 2006 ; SOLÍS-MÉNDEZ *et al.*, 2013).

II.4. Méthodes d'observation de la microstructure des fromages

L'étude de la structure d'un aliment consiste principalement à observer par des méthodes appropriées (microscopiques ou autres) l'édifice tridimensionnel des constituants et à mesurer leur répartition (HARDY et SCHER, 1997).

Le tableau 02 compare les différentes techniques microscopiques utilisées dans le domaine des produits laitiers (AUTY, 2011).

Tableau 02 : Comparaison des techniques microscopiques utilisées dans le domaine des produits laitiers (AUTY, 2011)

Technique	Type de rayonnement incident	Gamme de longueur (nm)	de d'onde	Résolution approximative (nm)	Application
Stereomicroscopie	Photons	400–750		5000	Vue d'ensemble de la microstructure, organisation brute des composants
Microscopie optique composé	Photons,	400–750		300	Localisation des ingrédients, taille des gouttelettes d'une émulsion
Microscopie confocale	Photons	350–1200		200	Localisation des ingrédients, reconstruction tridimensionnel, les processus dynamiques
Microscopie électronique balayage	à Electrons	0,001–0,01		4	Grande profondeur de champ, simulé vue en trois dimensions
Microscopie électronique transmission	à Electrons	0,001–0,01		0,2	Visualisation des structures macromoléculaires

En complément aux informations de ce tableau, la figure suivante (Fig. 3) donne une visualisation de la structure de quelques produits laitiers et fromages observés par la Microscopie électronique à balayage (MEB) et par la Microscopie Confocal.

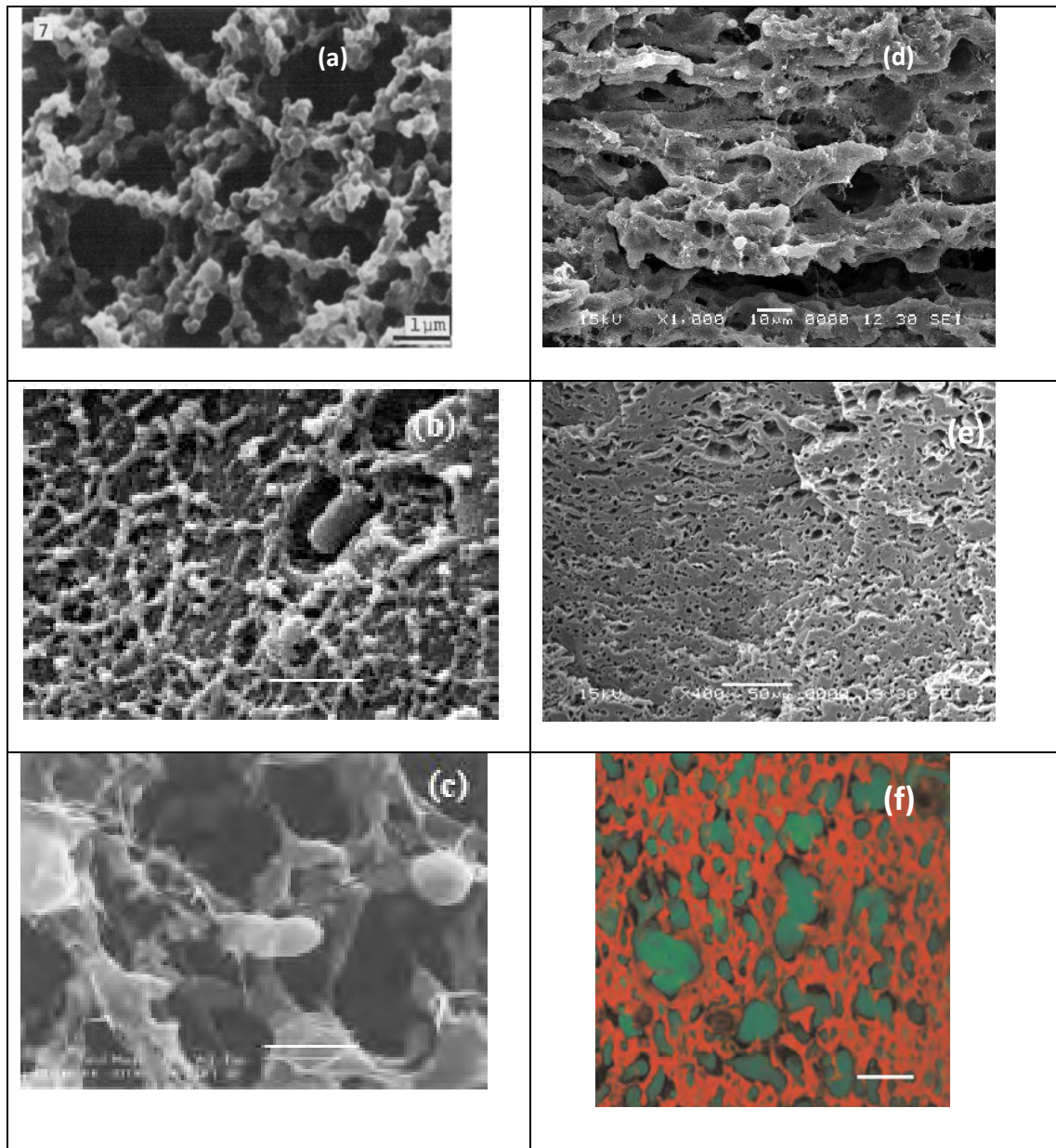


Figure 3 Observation microscopique de quelques produits laitiers

(a).observation au MEB du yaourt (KALAB, 1979 ; (b) observation au MEB du Rayeb et (c) *Lben* traditionnel tunisien (SAMET-BALI *et al.*, 2012) ; (d) observation par MEB des fromages Palermitano et (d) du ragusano, (f) (IMPOCO *et al.*, 2006) Observation Cheddar par MCBL avec marquage des lipides en vert et protéines en rouge), l'échelle est de 25mm (AUTY, 2011).

Après avoir donné un aperçu sur les principaux aspects de l'affinage des fromages nous accomplissons cette partie bibliographique par la signification du terroir des fromages traditionnels ainsi que la question sur leurs classifications.

III. Terroir des fromages traditionnels et classification

III.1. Signification du « terroir » des fromages

Les fromages, tout particulièrement ceux traditionnels, bénéficient d'une place incontournable parmi les différentes préparations alimentaires. Cette tradition de fabrication englobe non seulement le savoir-faire des différentes générations mais aussi un mariage intime entre la terre et les animaux laitiers, d'où la nécessité de préserver cette tradition dans son environnement naturelle. Selon GUERRERO *et al.* (2009 cité par MONTEL *et al.* 2014), le consommateur européen définit le fromage traditionnel comme « un produit fréquemment consommé ou associé à des célébrations et/ou à des saisons, normalement transmet de génération à une autre, fabriqué avec précision de manière spécifique selon patrimoine gastronomique avec peu ou sans manipulation, distingué et connu par rapport à ses propriétés sensoriels et associé à une zone local, région ou pays ».

Le terroir pour le lait et le fromage est donc «**une aire géographique caractérisée par des conditions de milieu et des types d'animaux qui, exploités par l'homme, conduisent à des produits spécifiques** » (GRAPPIN et COULON, 1996). Chaque fromage traditionnel provient de systèmes complexes qui lui donnent des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Les différents éléments qui entrent dans la typicité de chaque fromage peuvent être regroupé ensemble selon le schéma donné en figure 4 par DORIOZ *et al.* (2000).

Ils sont liés à divers facteurs de biodiversité, comme l'environnement, le climat, la prairie naturelle, la race des animaux, l'utilisation de lait cru et de sa microflore naturelle, la technologie fromagère s'appuyant sur le savoir-faire unique des hommes et non pas sur une technologie automatisée, les outils historiques et enfin les conditions naturelles d'affinage (LICITRA, 2010).

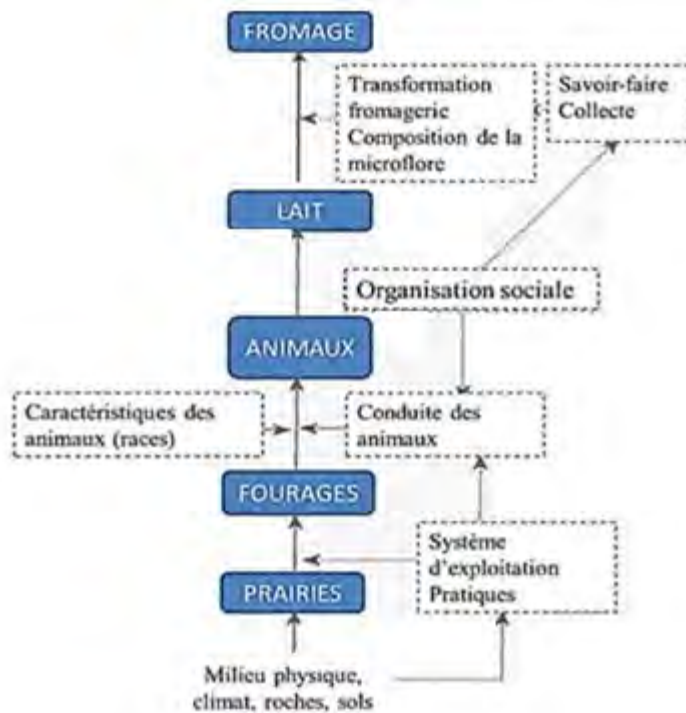


Figure 4 : Inventaire des liens possibles entre terroir et fromage (DORIOZ *et al.*, 2000) (En traits pleins : flux d'éléments et de matières ; en trait pointillés : facteurs de régulations)

Dans le monde certains fromages de terroir sont règlementés sur la base d'études, d'une part sur la composition et les caractéristiques et d'autre part sur les conditions locales de production du lait. Les relations entre les caractéristiques des fromages et leur territoire d'origine a renforcé leur préservation et leur protection. La désignation « terroir » qui accompagne souvent le nom de certains fromages traditionnels est apparue en premier lieu en France puis elle s'est propagée dans l'ensemble de l'Europe. Nous retrouvons différentes appellations dont : fromages AOP « Appellation d'Origine protégée » en Europe, fromages AOC « Appellation d'Origine Contrôlée » en France (BERTOZZI et PANARI, 1993) et fromages DOC « Dénomination d'origine Contrôlée » en Italie, Espagne et Grèce.

A l'instar de ces appellations, plus de 150 fromages traditionnels ont été répertoriés par la commission européenne en fromages PDO ou PGI (Protected Designations of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI) dont la plus part sont originaires de France et d'Italie.

En l'Algérie, aucun fromage n'a fait l'objet d'étude pour sa protection et sa préservation. Plusieurs traditions fromagères sont en voie de disparition et méritent une attention particulière.

III.2. Classification des fromages et appellations

« Fromage » est un mot qui désigne un produit alimentaire. Réellement, il fait référence à une grande variété de produits dont les caractéristiques sensorielles et autres sont tellement différentes. Cette grande diversité soit dans les propriétés ou dans les modes de fabrication, a rendu difficile leur classification (CHAMBERS *et al.*, 2005). Selon KOSIKOWSKI (1985), il existe environ 2000 variétés de fromages et approximativement 500 d'entre eux sont regroupés par la Fédération Internationale du Lait (FIL ou IDF). La classification des fromages est d'autant plus compliquée à établir que les caractères sur lesquels pourrait se fonder une classification se confondent. En général, les principaux critères de classification prennent en considération les points suivants (MIETTON *et al.*, 2004) :

- La nature de la matière première : lait cru ou pasteurisé ; lait entier, écrémé, enrichi en protéines ou ultrafiltré ; lait frais ou reconstitué ; lactosérum ;
- L'origine du lait (vache, chèvre, brebis, bufflesse, et mélange de laits de différentes espèces) ;
- La composition des fromages en matières grasses et en extrait sec influant sur leur consistance (pâte dure, demi dure, molle) ;
- La technologie de fabrication ;
- Le pays ou la région de fabrication.

Plusieurs approches ont été proposées pour la classification des fromages, nous citons quelques exemples :

- Classification selon la fromagerie et le mode d'affinage proposée par OLSON (1979 cité par OLSON, 2008) : fromages naturels (fromages à coagulation acide ou enzymatique) et fromages fondus ;
- Classification des fromages selon la composition, la fermeté et l'agent de maturation proposée par VEDAMUTHA et WASHAM (1983 cité par OLSON, 2008) : fromages molles de 50 à 80% d'humidité, fromages semi-molles de 39 à 50% d'humidité, fromages durs avec un max. de 39% d'humidité et fromages à pâte très dure avec un max. de 34% d'humidité, fromages au lactosérum et fromage épicé ;
- Classification selon le pH et la teneur en calcium proposée par LAWRENCE *et al.* (1984, cité par LAWRENCE *et al.*, 1986) ;

- Classification des fromages d'Appellation d'Origine Contrôlée (A.O.C.) proposée par HENQUIN et HARDY (1995) selon la composition, la teneur en Ca et la texture des fromages ;
- Classification des fromages acides selon la technologie donnée par SCHULZ-COLLINS et SENGE (2004). Les fromages sont classés en fromages frais et fromages affinés. Les fromages affinés sont divisés en deux catégories: les fromages saumurés (subdivisés en fromages saumurés Blanc (A) et fromages saumurés Divers (B) et les fromages salés à sec. Les fromages affinés à coagulation acide ont généralement une saveur et une odeur très forte, une couleur légèrement jaune et une texture légèrement friable. Dans les fromages acides à pH inférieure à 4,7 beaucoup de micro-organismes tels que les bactéries lactiques, les levures, les moisissures et les autres bactéries non pathogènes sont présents et adaptés à un tel environnement pour survivre et croître avec de faibles risques microbiens.
- D'autre part, la classification des fromages selon la norme internationale A-6 (1978-FAO/OMS) du *codex alimentarius* demeure plus générale. Elle classe les fromages selon trois critères, la teneur en eau dans le fromage dégraissé (**TEFD**), et la teneur en matière grasse dans la matière sèche (**MGES**), et les principales caractéristiques d'affinage (ECK, 1986).

En conclusion, il est très difficile de trouver une seule classification qui regroupe tous les fromages selon leurs technologies et leurs caractéristiques. En effet, deux fromages qui sont tellement différents d'un point de vue sensoriel peuvent se classer dans le même groupe (COKER *et al.*, 2005). FOX (1993) et FOX *et al.* (2004) discutent avec beaucoup de détails cette difficulté de classification. Un modèle de fiche caractérisant les fromages est proposé selon FOX (1993). Cette fiche-questionnaire est envisagée pour une identification uniforme des fromages permettant ainsi leur classification en se basant sur plusieurs critères liés à la fois à la technologie et à la composition globale et fine ainsi que sur les caractéristiques sensorielles (Annexe 1). En parallèle, COKER *et al.* (2005), regroupent les différentes méthodes utiles pour l'étude et la classification des fromages en se basant sur des méthodes analytiques de la protéolyse et de la lipolyse (analyse de la composition, analyse par PAGE, RP-HPLC, analyse des acides aminés, couplée à la mesure des propriétés sensorielles ou de texture) et des méthodes statistiques, sans omettre la spécification de la technologie.

IV. Situation du fromage traditionnel Algérien *Bouhezza*

La situation des produits laitiers traditionnels algériens est une image de la situation de la filière lait dans le pays. Celle-ci, se trouve depuis des décennies dans une phase critique, face à une production locale en lait cru insuffisante avec un faible taux de collecte évalué à 13 % soit à 560 million L de lait en 2011 (DRDPA 2011) et une demande en régulière hausse avec une consommation qui a passée de 120 L/hab/an en 1990 à 120 L/hab/an à nos jours (KACIMI EL HASSANI, 2013). La consommation algérienne de lait et des produits laitiers est parmi les plus importantes dans la région Nord-africaine. D'autres facteurs viennent aggravés cette situation dont une politique basée sur l'importation du lait en poudre et l'augmentation de son prix sur les marchés internationaux. Malgré les efforts consentis dans ce domaine, la production nationale ne couvre toujours pas les besoins du marché, et l'année 2014 est un exemple concret de cette situation marquée par plusieurs perturbations sur le marché. A l'échelle mondiale l'Algérie se situe parmi les premiers grands pays déficitaires en lait (KACIMI EL HASSANI, 2013).

En plus des problèmes liés à la production du lait cru, diverses autres raisons viennent s'ajouter pour aggraver la situation de nos fromages traditionnels. Les transformations traditionnelles du lait sont en partie mal connues, en partie délaissées et, malheureusement, en totalité non valorisées. D'autre part, nous pouvons citer l'absence d'écriture sur l'histoire de l'alimentation de notre pays, la non transmission et donc la méconnaissance du patrimoine, l'exode rurale, la dévalorisation des traditions et le changement des habitudes alimentaires.

Malgré cette situation, les potentialités du pays sont énormes pour promouvoir et relancer à fond la production du lait cru et donc la production des fromages traditionnels. Le pays possède, en plus de son sol et son climat méditerranéo-saharien, une riche tradition laitière et fromagère et aussi une grande possibilité de diversification de ses sources laitières par un élevage varié et complémentaire entre le nord et le sud.

Parmi les produits traditionnellement fabriqués peuvent se distinguer la catégorie des « laits fermentés » et la catégorie des « fromages » proprement dits. A l'exception de certains laits fermentés (*Lben et Rayeb*) et fromages (*Klila, Djben et L'baa*), qui sont les plus connus et géographiquement les plus répandus, tous les autres produits n'ont pas fait l'objet d'études détaillées. Ils sont restés confinés à leurs niches géographiques d'origine.

Nos investigations, nous ont amené à recenser une dizaine de fromages traditionnels dans différentes régions du pays. Parmi les moins connus, nous avons le fromage *Bouhezza*, la *Mechouna* et la *Madeghissa* à l'Est de l'Algérie (Région des *Chaouies*), la *Takammèrite* (Ghardaïa) et *l'Aoules* au sud et *l'Igounanes* au nord centre (Région de la *Kabily*).

L'étude sur le fromage *Bouhezza* a été initiée en 2000 au sein du Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire (LNTA, équipe TEPA). Les premières informations publiées ont concernés le diagramme de fabrication traditionnel du fromage (ZAIDI *et al.*, 2000). Les informations données dans ce chapitre ont été synthétisées à d'après AISSAOUI ZITOUN (2004).

La fabrication fromagère de *Bouhezza* est anciennement pratiquée chez quelques populations *Chaoui* qui vivent dans la région des Aurès et au-delà même, couvrant une grande partie de l'Est de l'Algérie. Sa spécificité est l'utilisation d'une peau d'animaux « *Chekoua* » comme contenant de la matière première et séparateur de lactosérum-et aussi du *Lben*. Un salage en masse et des ajouts successifs de *Lben* et de lait cru permettent l'accumulation de la pâte fromagère dans la *chekoua*. Ainsi, et après au-moins 4 semaines le fromage est affiné.

IV.1. Terroir du fromage *Bouhezza*

Les premiers résultats d'enquête sur la délimitation géographique du terroir de *Bouhezza* ont pu confirmer la pratique dans l'Est de l'Algérie, dans la zone des Chaouia. (AISSAOUI ZITOUN, 2004). La fabrication existe principalement dans la ville d'Oum El Bouaghi, de Batna (commune de Batna et El Maither) et à Khenchla (Kais).

IV.2. *Chekoua* du fromage *Bouhezza*

La fabrication du fromage nécessite la confection de la peau d'animaux sous forme de *Chekoua*. La *Chekoua* de *Bouhezza* se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau de l'animale et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, elle joue à la fois le rôle d'un séparateur de phase, c'est à travers les perforations naturelles de la peau que le lactosérum est exsudé et d'un contenant de la masse fromagère qui s'accumule au cours du temps.

IV.3. Conditions de la fabrication traditionnelle du fromage *Bouhezza*

La fabrication traditionnelle du fromage *Bouhezza* n'obéit pas aux règles générales de la fromagerie où les étapes de coagulation, salage, égouttage et affinage sont des étapes successives. Le procès de *Bouhezza* assure la réalisation de ces différentes étapes simultanément et continuellement sur plusieurs semaines voire des mois. Il débute habituellement en mars/avril, partant d'une quantité initiale de *Lben*, compléter durant toute la période de fabrication par des ajouts de *Lben* et à la fin de lait cru, à condition que le *Lben* utilisée soit peu gras et peu acide. La durée de fabrication de *Bouhezza* est comprise entre 2 à 9 mois, elle est en fonction de l'abondance laitière et de la taille de *Chekoua*.

Le fromage *Bouhezza* est fabriqué avec le lait de vache, de chèvre, ou de brebis avec la possibilité de faire des mélanges de lait. Le salage se fait en masse et il est apprécié durant la fabrication par dégustation. La *Chekoua*, dans laquelle le *Lben* et le sel sont ajoutés régulièrement est suspendue dans un endroit aéré et à l'ombre. La face externe de la peau est nettoyée par raclage et rinçage avec l'eau. Une fois le fromage est affiné un ajout de lait cru est réalisé pour ajuster l'acidité et la salinité du fromage. A la fin, le fromage est épicé avec la poudre de piment rouge piquant qui est mélangée avec une quantité du lait cru lors du dernier ajout et bien homogénéisé. L'addition de *H'rissa*, poivron noir, vinaigre, et colorants (généralement le rouge) est aussi possible.

Le fromage est le plus souvent conservé dans la *Chekoua*. Il peut être conservé dans d'autres récipients que la *Chekoua* soit en verre, en céramique, ou en plastique. *Bouhezza* peut être consommé sous forme de pâte plus ou moins ferme, de tartine sur pain ou déshydraté après séchage et broyage manuel (assaisonnement de plats traditionnels, *Aiche*, Couscous, etc.). Il y a encore une exception de l'utilisation de ce fromage dans la préparation du *Rfiss* et dans la salade.

1

2

3

4

5

6

MATERIEL

7

ET

8

METHODES

9

I. Méthodologie de caractérisation du *Bouhezza*

Les études sur la caractérisation du fromage *Bouhezza* et sa classification permet la confirmation des indications tirées de l'enquête dont la description du diagramme de fabrication type et l'établissement d'une fiche technique plus complète. La démarche suivie dans notre étude se base sur des informations collectées du terrain (enquête) et sur des expérimentations élaborées compte tenu des résultats déduits de l'enquête permettant une caractérisation scientifique rigoureuse du fromage étudié. La figure suivante illustre cette démarche (Fig.5).

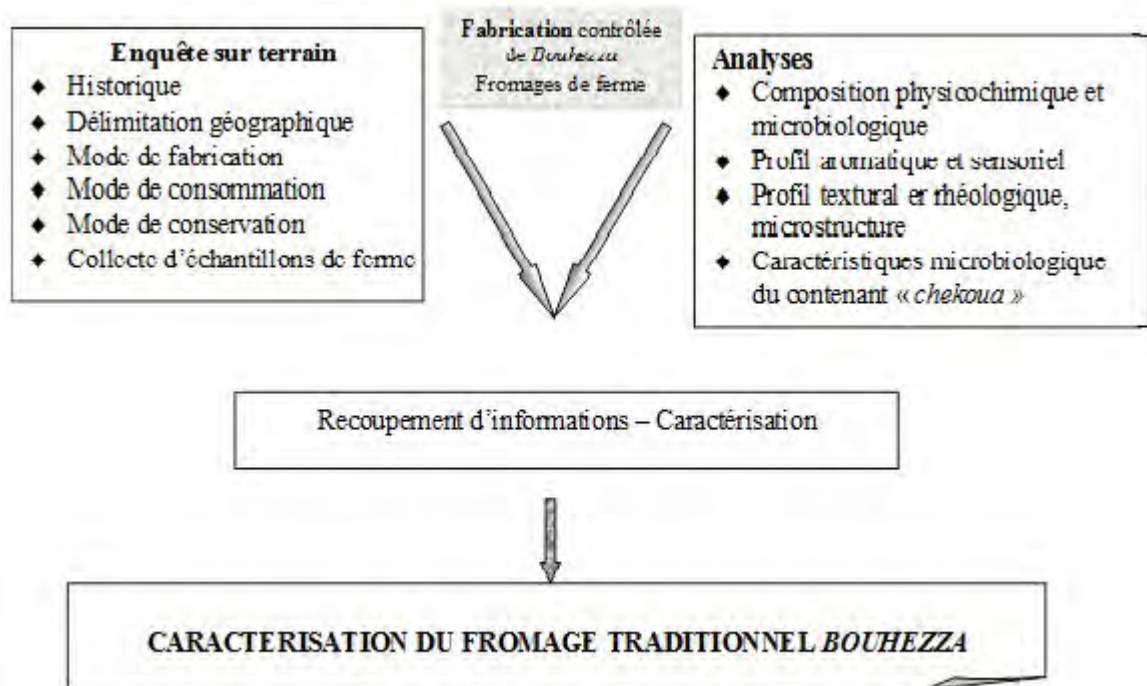


Figure 5 : Etapes de la méthodologie de caractérisation du fromage *Bouhezza*

L'approche pratique pointant la caractérisation de *Bouhezza* comprend deux axes dépendants : l'enquête et la caractérisation expérimentale d'échantillons de fermes et de fabrications contrôlées. Chaque axe donne une part de la caractérisation et le regroupement et la synthèse des données générées par ces deux volets permettent d'atteindre le but visé dans notre travail.

Le premier axe approche la caractérisation du fromage par le biais d'une enquête dans la zone de fabrication du *Bouhezza*, en complément des résultats déjà établis (ZAID *et al.*, 2000 ; AISSAOUI ZITOUN, 2004). Ses principaux objectifs sont la délimitation géographique de la zone de fabrication du fromage et la collecte d'un maximum d'informations sur la pratique de *Bouhezza* et d'échantillons de fromages de fermes.

La caractérisation de *Bouhezza* par l'enquête (1^{er} axe) reste descriptive et une partie des informations recueillies nécessite d'être précisée sur les fromages de fermes et d'expérimentations. L'expérimentation au laboratoire consiste en l'étude du mode de fabrication adopté de *Bouhezza*, dont le diagramme est issu de l'exploitation des résultats de l'enquête. Le complément de caractérisation, notamment sa composition et l'identification de sa flore lactique, son profil aromatique et sensoriel, son profil textural et rhéologique seront prospectés par une approche expérimentale au laboratoire. Ceci concerne le deuxième axe. Cet axe est finalisé par une étude complémentaire de la caractérisation du fromage *Bouhezza*, mais qui cible l'écosystème du contenant de la masse du fromage, l'outré en peau de chèvre « *Chekoua* ». Tout le matériel et toutes les méthodes utilisés dans notre étude sont exposés dans cette partie.

II. Caractérisation par l'enquête

La confirmation des résultats déjà obtenus nécessite un rapprochement d'un nombre plus important de familles se trouvant dans la zone des *Chaouia*. Les premiers résultats, ceux de ZAIDI *et al.* (2000) et AISSAOUI ZITOUN (2004) ont montré que la pratique de *Bouhezza* est absente dans les zones limitrophes des *Chaouia* (ville de Constantine, Skikda, Annaba, Sétif et Biskra). Concernant la délimitation à l'intérieur de la zone des *Chaouia* l'enquête doit toucher des familles des wilayas de Batna, Khenchela, Oum El Bouaghi et Tébessa.

Chaouia est la dénomination donnée aux habitants berbères de l'Aurès. Ces habitants étaient connus par leur activité pastorale et principalement par l'élevage ovin. Le mot « *Chaouia* », qui découle du mot arabe « El chett ou El chieh » et qui signifie ovin (s), se réfère à leur élevage ovins (EL-HEOUARI 1983 cité par EL-CHAFII 1987). Ces berbères se sont localisés définitivement dans les zones montagneuses de l'Aurès et ont délaissé la vie du déplacement.

La zone de l'Aurès se situe dans l'Est algérien. L'Aurès est le vaste quadrilatère montagneux dont la superficie, du nord au sud est d'environ 100 km² ; et de l'est à l'ouest est d'environ 80 km². Le nom de l'Aurès à l'époque coloniale désignait l'ensemble des montagnes qui se situent entre le sud de Constantine et le Nord de Biskra. De l'ouest à l'est, elles regroupent le massif montagneux qui s'étend entre *Djbel Boutaleb* et *Djbel Hodhna* jusqu'aux frontières de Tébessa ; la ville principale de l'Aurès est Batna. En 1917, la daïra de Batna, qui appartenait administrativement au département de Constantine,

comprenant les communes de Batna (chef-lieu de la ville), Aris, Khenchla, Ain Touta, Ain Lakser, Marouana, et d'autres villages et agglomérations (BOUAZZIZ, 1984 cité par EL CHAFII 1987). De nos jours, la ville de Batna est le chef-lieu de wilaya comprenant 61 communes. La zone des *Chaouia* s'étend sur plusieurs wilayas et dépasse les limites de l'Aurès ; ceci est peut être dû à l'exode rural des familles vers les villes limitrophes. La ville principale des *Chaouia* est Batna, aussi il y'a Tébessa, Khenchela et Oum El Bouaghi, Guelma et Souk H'ras.

II.1. But de l'enquête

Le but de cette enquête est de prospecter la pratique traditionnelle du fromage *Bouhezza* dans la région Est de l'Algérie, de délimiter sa zone géographique et d'identifier sa fromagerie. Aussi, elle vise la collecte des échantillons de fromages de différentes fermes.

II.2. Population cible

Nous avons questionné le maximum de familles, par interview, sur la pratique du *Bouhezza* dans différents endroits de la zone des *Chaouia* (wilayas de Batna, Khenchela, Oum El Bouaghi et Tébessa) et de sa périphérie. L'échantillon global est constitué de 841 familles.

II.3. Déroulement de l'enquête

La réalisation de l'enquête au niveau des wilayas précitées s'est faite entre 2005 et 2009, par des étudiants de fin de cycles 5^{ème} année ingénieur, (NIMMER, 2006, BEDIAR et BENHANAIA, 2006, LEMOUCHI, 2008 et BENMESSAI et FETHALLAH, 2009) que nous avons suivi nous-même de près.

II.4. Questionnaire

Le questionnaire utilisé est structuré comme suit (Annexe II) :

1. Délimitation géographique faite sur la base des informations personnelles données par l'enquêté (adresse, zone rurale ou urbaine et origine) ;
2. Mode de fabrication de *Bouhezza* comprenant la préparation du contenant « *Chekoua* » (type, caractéristique, traitement de la peau) et la fabrication proprement dite (matières premières de fabrication, salage, égouttage, conditions et période de fabrication) ;
3. Conservation et défauts de fabrication de *Bouhezza* (mode et moyens de conservation) ;

4. Mode de consommation habituel et coutumes.

Ces aspects nous permettent d'établir la ou les diagrammes de fabrication de *Bouhezza* et une partie de sa fiche technique. Le questionnaire a été traduit en arabe pour faciliter le dialogue avec les enquêtés. Aussi le rapprochement aux familles nécessite souvent la présence d'une personne de leur connaissance.

II.5. Traitement des données de l'enquête

La saisie et le traitement des données de l'enquête sur les conditions de la fabrication du fromage *Bouhezza* ont été effectués par le logiciel SPSS (version 08, 1993).

III. Caractérisation expérimentale

III.1. Echantillons du fromage *Bouhezza*

III.1.1. *Bouhezza* de fermes

Vingt-deux (22) échantillons de fromage *Bouhezza* de fermes ont été collectés durant la période de la réalisation de cette enquête pour une caractérisation complémentaire au laboratoire. Le tableau suivant (Tab. 3) donne l'origine et la durée d'affinage de l'ensemble de ces échantillons.

Tableau 3. Origine et durée d'affinage des échantillons du fromage *Bouhezza* de fermes

Wilaya	Commune	30 j (jours)	40 j	60 j	75 j	90 à 150j
Oum El Bouaghi	Ain fakroun	2	3	3	2	3
	Ain baida	1				
	Ain karcha			1	1	1
BATNA	kais		2	1		
Khenchela	CHMORA			1		
Total		3	5	6	4	4

Le lait utilisé dans ces fabrications est le lait de vache et le salage est réalisé en masse avec un taux variable d'une famille à une autre de 1 à 3 cuillères à soupe par litre.

Nous notons que la plupart des fromages de fermes sont originaires de la commune d'Ain Fakroun (wilaya d'Oum El Bouaghi) où nous avons noté précédemment un nombre important de pratiquants de cette fabrication. La durée d'affinage des familles varie elle aussi d'une ferme à une autre, cependant, la période d'affinage minimale a été d'un mois. Aussi, la durée d'affinage de la plus part des échantillons est de 40 à 75j.

III.1.2. *Bouhezza* des fabrications contrôlées

Six (06) fabrications contrôlées de *Bouhezza* ont servi à la caractérisation physico-chimique et microbiologique globale. Deux d'entre elles ont servi à une caractérisation plus poussée (suivi de la lipolyse, identification des bactéries lactiques, étude du profil aromatique et textural) afin d'apporter le maximum d'informations sur l'évolution des différentes caractéristiques du fromage *Bouhezza* durant la fabrication- affinage.

Les fabrications de *Bouhezza* sont menées en parallèles, durant dix semaines, réparties sur trois années. Le diagramme suivi dans la fabrication de *Bouhezza* est déduit des résultats d'enquête sur le fromage dans la zone Est de l'Algérie. Nous aborderons dans ce qui suit la méthodologie adoptée pour la préparation de la «*Chekoua*» et ensuite celle de la fabrication proprement dite.

III.1.2.1. Matières et matériel des fabrications contrôlées

- ***Chekoua de Bouhezza*** : La préparation et la confection de la *Chekoua* en vue de la fabrication de *Bouhezza* sont illustrées dans les figures suivantes (Fig. 6 et 7). Cette préparation sans tannage, avec le sel et le genièvre, est spécifique et diffère de celle réservée à l'obtention de *Chekoua* ou contenant pour le barattage du *Lben*. La préservation de la perméabilité de la peau lui permet d'évacuer le lactosérum à l'extérieur comme un ultrafiltre et de jouer le rôle de séparateur de phases. Les peaux d'animaux utilisées sont de chèvres non fendues de 6 à 8 mois d'âge et d'une capacité moyenne de 10 L.

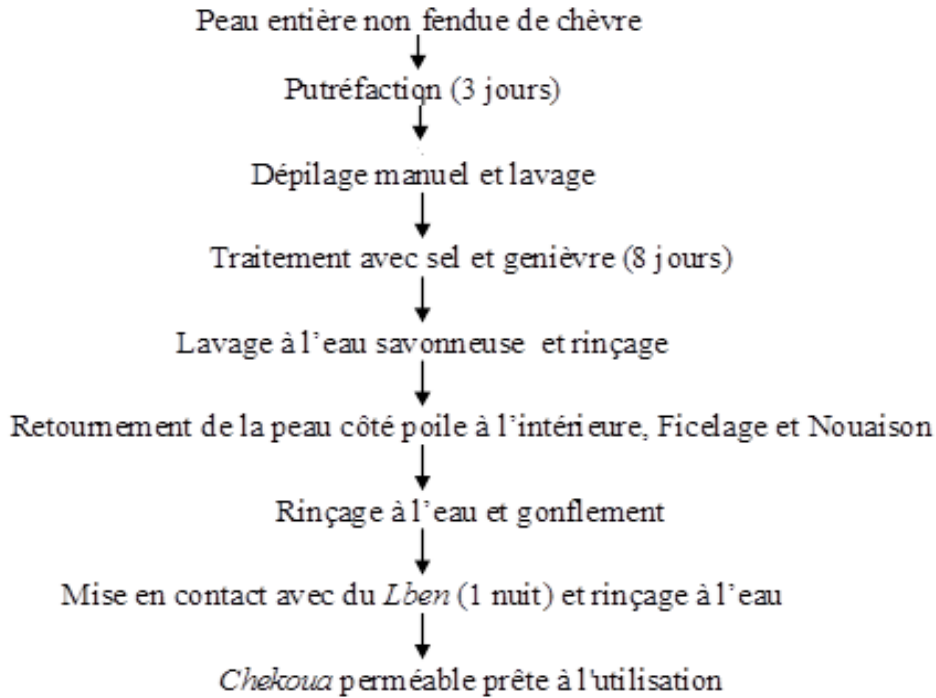


Figure 6 Diagramme adopté pour le traitement et la confection de la *Chekoua* du *Bouhezza*



Figure 7 : Présentation photographiques des différentes étapes de la préparation de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza*

- **Lben et lait cru** : Le lait de vache et le *Lben* sont fournis par un crémier situé à Ain Smara. Le *Lben* est préparé selon la méthode artisanale en utilisant une baratte électrique en bois. Le lait n'a subi aucun traitement thermique.
- **Sel** : Le sel utilisé est produit par ENASEL-Algérie, de granulométrie moyenne en sachet de 1 Kg.

- **Piment rouge piquant et genièvre :** Le piment rouge piquant et le genièvre ont été achetés d'un épicier spécialisé dans la vente des plantes. Ces produits sont vendus séchés et utilisés après broyage. Le genièvre utilisé est celui de Phénicie vendu sous forme de mélange d'écorce, baies et fruits. Le fruit est de couleur pourpre et de taille moyenne.

III.2.2.2. Diagramme traditionnel adopté

La fabrication de *Bouhezza* est réalisée sur dix semaines pour assurer un affinage complet du fromage. Elle a été lancée avec une quantité initiale de *Lben* complétée durant toute la période de fabrication par des ajouts réguliers de *Lben* jusqu'à la 9^{ème} semaine et de lait cru durant le reste de la période. Le salage est réalisé dans le *Lben* avant son ajout dans la *Chekoua* à raison de 25 g/L. Une fois le *Lben* ou le lait est ajouté, le col de la *Chekoua* est noué puis une bonne homogénéisation de son contenu est réalisée par un léger pétrissage, puis la *Chekoua* est suspendue dans un endroit aéré et à l'abri du soleil. Un minimum d'hygiène est assuré, un jour sur deux, par un rinçage à l'eau et un raclage de l'extérieur de la peau.

Au cours de cette période, la température et l'humidité de l'air moyen sont respectivement de $26,8 \pm 4$ °C et $52,6 \pm 8.4$ %. La figure suivante (Fig. 8) présente les différents ajouts dans les *Chekouas* de *Bouhezza*.

Des analyses physicochimiques et microbiologiques ont été réalisées sur le *Lben*, le lait cru et le fromage en cours de fabrication-affinage, le jour même, après prélèvement au laboratoire. Les différents stades de prélèvements sont : 0 j (*Lben* de départ), 7 j, 15j, 28j, 42 j, 56j et 70j. Par ailleurs, les échantillons destinés à l'étude de la protéolyse et l'identification des bactéries lactiques ont été congelés à -18°C jusqu'au jour d'analyse.

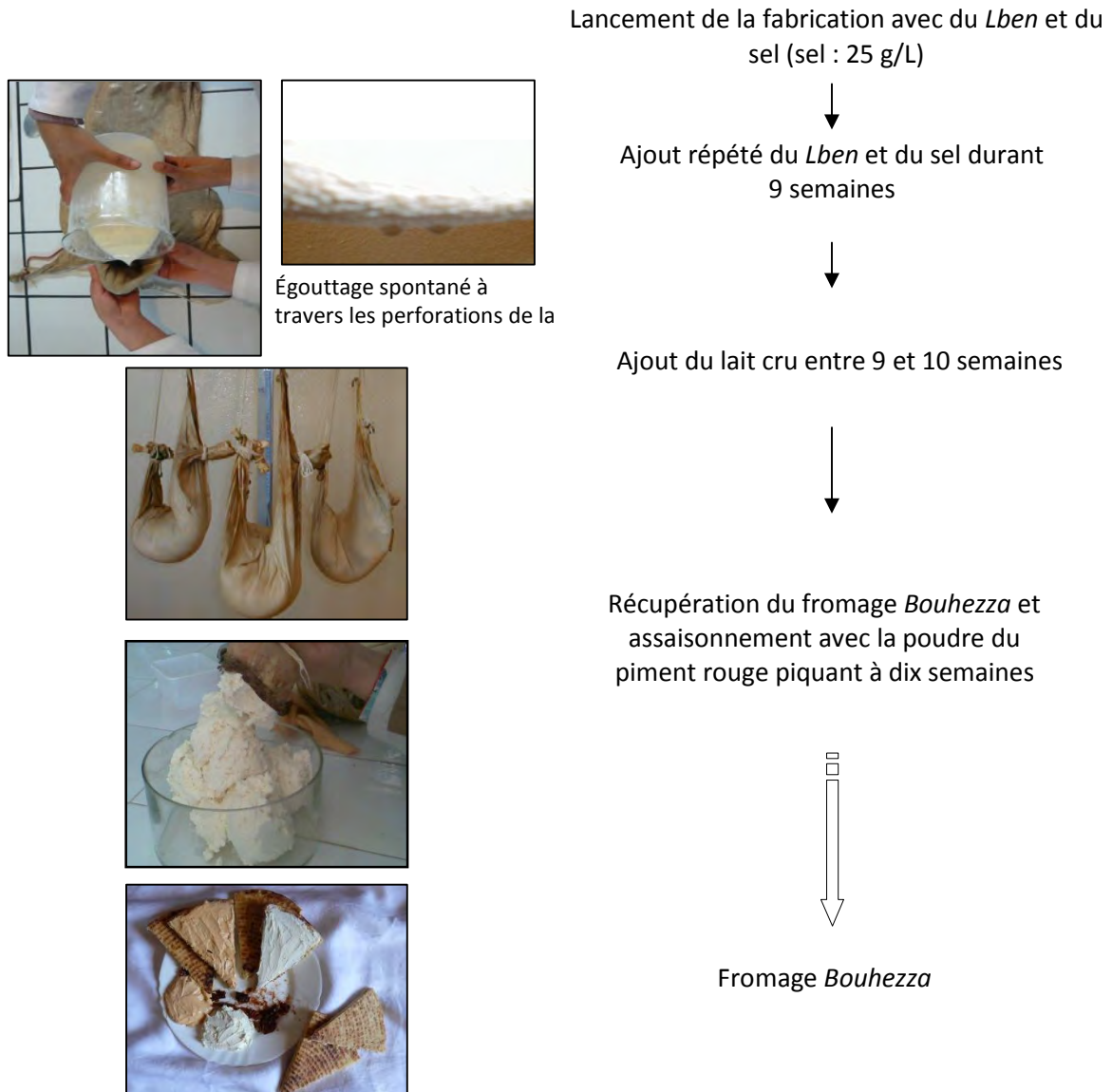


Figure 8 : Diagramme simplifié de la fabrication contrôlée du fromage *Bouhezza*

III.2. Caractérisation de l'écosystème microbien et identification des bactéries lactiques

III.2.1. Méthodes de dénombrements des flores microbiennes

Les analyses microbiologiques du fromage *Bouhezza*, du lait et du *Lben* ont été réalisées comme il est expliqué ci-dessous. Pour le fromage la solution mère est préparée avec 10 g de fromage et 90 mL de solution de citrate trisodique à 2% (MOSSEL *et al.* 1995 ; GUIRAUD 2003 et Normes ISO).

- **Dénombrement de la flore mésophile « totale »** réalisé dans la gélose Plate Count Agar (PCA, Difco, France). Le milieu est ensemencé en profondeur et les cultures sont incubées à 30 °C pendant 72 h. Il est souvent nécessaire d'aller jusqu'à 10^{-7} pour les dilutions de fromage. Le dénombrement de cette flore pour le *Lben* n'a d'intérêt que pour suivre la fabrication de *Bouhezza* car c'est un lait fermenté (ISO 4833, IDF 2003) ;
- **Dénombrement des lactobacilles** par ensemencement dans le milieu MRS (De MAN, ROGOSA, et SHARP) à pH 5,5 qui convient bien à la culture des lactobacilles (LEVEAU *et al.*, 1991). L'incubation se fait à 30°C pendant 48 h (ISO 7889 IDF, 2003) ;
- **Dénombrement des streptocoques lactiques** par culture dans le milieu M17 (Difco, France) (LEVEAU *et al.*, 1991). L'incubation s'effectue à 30 °C pendant 3 jours (ISO 7889 IDF, 2003) ;
- **Dénombrement des coliformes totaux et fécaux** dans le milieu gélosé VRBG (Violet Red Bile Glucose, Merck, Allemagne) que nous ensemençons par incorporation et l'incubation est réalisée à 37°C/48 h et 44°C/24 h respectivement, pour les coliformes totaux et fécaux (CASTARAS, 1993) ;
- **Dénombrement des levures et moisissures** qui comprend les levures, *Geotricum candidum* et les moisissures. La culture se fait sur milieu OGYE avec ajout de 100 mL/L d'oxytétracycline à 1mg /mL. Le milieu est ensemencé en surface et incubé à 20-25 °C pendant 3 à 5 j. Toutes les colonies d'aspect lisse ou filamenteux sont comptées (ISO 6611-IDF 94, 2004) ;
- **Dénombrement des *Staphylococcus aureus*** en surface sur le milieu gélosé de Baird-Parker selon la méthode (UNI EN ISO 6888-1, 2004). Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, les positions de toutes les colonies typiques présentes ont été marquées sur le fond des boîtes qui ont été mises une deuxième fois pour incubation dans les mêmes conditions avec marquage de toutes nouvelles colonies. Les colonies caractéristiques sont noires, brillante et convexes dont le diamètre est de 1,5 mm après 24 heures d'incubation et de 1,5 à 2,5 mm après 48 heures d'incubation et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque.

- **Recherche de la flore pathogène par le système BAX[®]**: la recherche des bactéries pathogènes a été effectuée en utilisant le système BAX[®] qui est basé sur la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de détection des pathogènes dans les aliments (FRANCHIN *et al*, 2006), et dans les échantillons environnementaux (ANONYME, 2007). Ceci en recherchant un fragment de l'ADN de l'organisme cible. La recherche et la détection ont concerné *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli O157 : H7* et ont été réalisées avec l'appareil BAX[®]System (Dupont Qualicon, UK). Le protocole détaillé de la recherche est mentionné en Annexe III. Il comprend pour chaque pathogène les même trois étapes suivantes mais avec des réactifs spécifiques pour chaque pathogène :

- a) Pré enrichissement et enrichissement en milieu sélectif ;
- b) Lyses des cellules (Kit spécifique du pathogène) et libération de l'ADN ;
- c) Amplification (Kit des réactifs de la PCR) et détection par fluorescence.

Les tubes préparés pour les trois pathogènes sont placés dans le thermocycleur du système BAX[®] et le programme d'amplification est lancé. Les résultats sont exprimés selon la présence ou l'absence des pathogènes (négative ou positive).

III.2.2. Méthode d'identification génétique des bactéries lactiques

L'identification de la flore lactique du *Bouhezza*, principale flore d'affinage, a été entreprise par deux méthodes : la méthode d'identification génétique (la PCR-TTGE : Polymerase Chain Reaction- Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis) et la méthode d'identification morphologique et biochimique.

Pour étudier la diversité génétique et la structure d'écosystèmes microbiens au cours du temps, sans isolement et sans phase de culture préalable, nous avons utilisé une des techniques d'empreinte génomique basée sur les gènes codant d'ARNr. Les ARN ribosomiques, dont la présence est universelle et conservée chez toute forme cellulaire, sont rapidement apparus comme des marqueurs de choix en phylogénie (FOX *et al.*, 1977 ; WOESE et FOX, 1977 cité par JANY et BARBIER, 2008).

La technique de la PCR-TTGE repose sur l'extraction des acides nucléiques, l'amplification par la réaction en chaîne par polymérase PCR (Polymerase Chain Reaction) des séquences de l'ADN ribosomique avec l'utilisation de nombreuses amorces amplifiant les régions variables de l'ADNr 16S et la séparation suite à la migration électrophorétique différentielle sur gel. Dans la méthode de la PCR-TTGE (Temporal Temperature gradient

Gel Electrophoresis) les produits d'amplification sont séparés sur gel vertical de polyacrylamide auquel on applique un gradient de température au cours du temps. Les fragments migrent jusqu'à ce que leur température de dénaturation soit atteinte. On obtient ainsi un profil de bandes, chacune d'entre elle correspondant à une espèce microbienne particulière. Cette empreinte génétique de l'écosystème à un instant donné permet également de suivre la dynamique des populations en termes de présence et/ou en terme d'activité. La séquence obtenue d'un isolant peut être comparée avec ceux d'espèce de Lactobacilles conservée dans des bases de données (database) (JANY et BARBIER 2008).

La PCR-TTGE est une méthode, très sensibles, elle est particulièrement intéressante pour évaluer la diversité microbienne au sein d'écosystèmes complexes et suivre la dynamique des populations au cours du temps sans recourir à la construction de banques de clones (MUYZER & SMALLA, 1998 ; GIRAFFA & NEVIANI, 2001 ; ERCOLINI, 2004). Dans les fromages, la technique de la PCR-TTGE a été souvent utilisée dans l'étude des bactéries lactiques (OGIER *et al.*, 2002 ; COEURET *et al.*, 2003 ; JANY et BARBIER 2008). Nous citons le Mozzarella et le Ragusano (Italie, COPPOLA *et al.*, 2001 ; LICITRA *et al.*, 2007) et le Roquefort (France, OGIER *et al.*, 2002).

La co-migration de bandes de différentes espèces ou l'alignement de plusieurs bandes pour une même espèce sont toutefois des limites de ces méthodes, en particulier pour l'étude d'écosystèmes complexes (HENRI-DUBERNET *et al.*, 2004). Elle peut être paliée par la PCR spécifique.

III.2.2.1. Mode d'extraction de l'ADN bactériens

L'ADN génomique a été extrait à partir de l'échantillon de fromage selon le protocole décrit par LICITRA *et al.* (2007). Le schéma suivant illustre les différentes étapes (Fig. 9). Une masse de 10 g de fromage est dissoute dans 90 mL de citrate trisodique à 2 % chauffé préalablement à 40-50 °C. L'homogénéisation de cette solution a été réalisée dans un stomacher pendant 5-10 min ensuite 1 mL a été prélevé et placé dans un Ependroff puis centrifugé à 4000 rpm pendant 20 sec. Le surnageant est éliminé alors que le culot est gardé pour en extraire l'ADN bactérien. Les étapes détaillées de l'extraction de l'ADN sont données en Annexe IV. Elles comportent la lyse des cellules puis récupération de l'ADN dans une colonne d'extraction et enfin purification de l'ADN et conservation pour amplification.

III.2.2.2. Amplification de l'ADN extrait

La région V3 de L'ADN codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) a été amplifiée selon PARAYRE *et al.* (2007) (Annexe IV) en utilisant les amorces universelles **V3P3-GC-Clamp**(5'-CCC GCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGCCTCGGGAGG CAGCAG-3') et **V3P2** (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Sigma, Italie), donnant un produit de PCR d'environ 233 bp (paires de base).

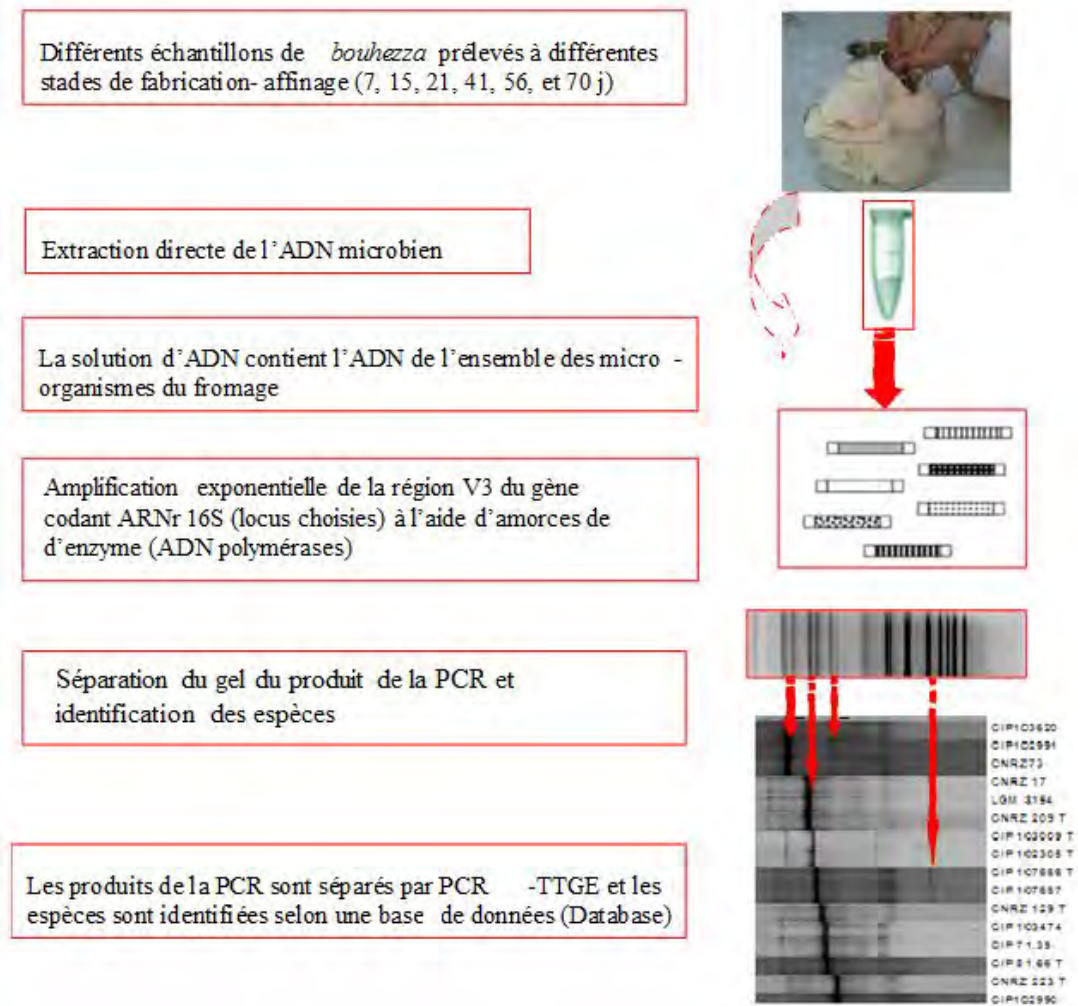


Figure 9 : Étapes de l'étude des bactéries lactiques du fromage par la méthode de la PCR-TTGE

Le mélange de la PCR (50 µL) est constitué de 40 µL de la Mix PCR (Tab. 4) et de 10 µL de l'échantillon de l'ADN extrait. L'amplification de la PCR a été exécutée sur un iCycler Therman cyler (Laboratoires Bio-Rad, Hercules, CA). Le programme d'amplification était 94°C pendant 2 min ; 35 cycles de 95°C durant 30 s, 63°C durant 30 s et 72°C pendant 1 min. Chacun de ces cycles est la succession de trois étapes : 30s de

dénaturation à 95°C, 30s d'hybridation à 63°C et 1 min d'élongation à 72°C. Ces cycles ont été finalisés par une extension 72°C pendant 5 min et la réaction a été stabilisée à 4°C.

Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel pour la PCR (MixPCR)

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

La pureté et la longueur des produits de la PCR ont été vérifiés sur un gel d'agarose à 1.5 % (p/v) (Eurobio, Les Ullis, la France) en comparaison avec une échelle d'ADN 100-bp (Fermentas Life Sciences, Vilnius, la Lituanie).

III.2.2.3. Migration sur gel de polyacrylamide et analyses en TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*)

Pour la migration, un gel de polyacrylamide a été utilisé. Ils ont été préparés avec 10 % (m/v) bisacrylamide (37,5:1), l'urée de 7 M d'urée (gel de séparation ou *Resolving*) et exécutées (run) avec le tampon 1,25 × TAE dilué à partir du tampon 50 × TAE (2 M de la base Tris, 1 M de l'acide acétique glacière, 50 mM d'EDTA, pH 8). Le gel de concentration a été à 8% d'acrylamide (*Stacking*) (Tab.5).

Tableau 5 : Composition des gels de séparation et de concentration de la TTGE

	Resolving	Stacking
Bisacrylamide 40 % (37,5:1).	6,25 mL	2,1 mL
TAE 50X (Tris-HCl 2M, acide acétique 1M, EDTA 50 mM)	0,625 mL	175 µL
Urée	10,5 µL	/
Temed	25 µL	7 µL
Persulfate d'ammonium à 10%	250 µL	70 µL
H ₂ O distillée	10,25 mL	7,35 mL

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre où s'effectue la réaction de polymérisation. Les monomères d'acrylamide vont polymériser sous forme de chaîne de

polyacrylamide. Le N, N'-méthylènebisacrylamide permettra la formation des pores dans le gel. Des radicaux libres provenant du persulfate d'ammonium stabilisés par le TEMED sont les catalyseurs de la réaction de polymérisation (CHAUMANDE, 2011).

Pour l'analyse de la TTGE, un système de détection de mutation universel DCODE (Laboratoires Bio-Rad, Hercules, CA) a été utilisé pour séparer la région V3 PCR des produits. Dix microlitres du produit de la PCR de chaque échantillon ont été ajoutés à 5 µL du tampon de charge (0,05 % bleu bromophenol, 0,05 % xylène cyanol, et 70 % de glycérol) puis déposés dans un puits de gel de concentration. Le marqueur qui a été utilisé contient des amplifiats de 12 souches (Tab. 6). 30µL de marqueur ont été déposés par puits (Le marqueur est obtenu à partir des laboratoires INRA-Agrocompus Rennes, France).

La migration a été exécutée à 41 V pendant 16 h avec un gradient de température jusqu'à 63°C à 70°C (avec un taux de 0,4°C·h⁻¹) pour les bactéries à teneur faible en GC. Les gels étaient marqués avec le bromure d'ethidium (0,6 µg de bromure d'ethidium par mL de tampon 1,25 × TAE) pendant 15 min et ensuite rincés pendant 15 min dans l'eau déminéralisée et photographiés sur une table à transillumination UV. Les bandes ont été analysées en utilisant la base de données développée par PARAYRE *et al.* (2007) pour l'identification d'espèces présomptives. Les marqueurs de taille utilisés (bas G/C %) dans notre PCR-TTGE sont donnés en tableau 6.

Tableau 6 : Les souches utilisées comme marqueur pour la PCR-TTGE

Souches	Volume de l'amplifiât
1- <i>Lactobacillus plantarum</i> CNRZ 211 ^T	
2- <i>Lactobacillus fermentum</i> CNRZ 209 ^T	
3- <i>Enterococcus faecium</i> LMG 8149	13 µL
4- <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 137	
5- <i>Enterococcus faecalis</i> CNRZ 137 13	
6- <i>Lactococcus lactis</i> CNRZ 105 ^T	
7- <i>Streptococcus thermophilus</i> CIP102303 ^T	
8- <i>Corynebacterium moorparkenese</i> CIP107183 ^T	15 µL
9- <i>Lactobacillus paracasei</i> LMG9192	
10- <i>Arthrobacterium nicotianae</i> CIP 82.107 ^T	
11- <i>Brevibacterium casei</i> CIP 102111 ^T	19 µL
12- <i>Propionibacterium cyclohexanicum</i> TL1365 ^T	
Tampon de charge	25 µL

III.2.3.Méthode d'identification morphologique et biochimique des bactéries lactiques

Le schéma suivant montre les principales étapes de l'isolement, de la purification et de l'identification de colonies prélevées des milieux des bactéries lactiques (MRS et M17). L'identification a été réalisée suite aux résultats de l'examen macroscopiques (l'aspect, la forme et la couleur des colonies) et microscopique (coloration de Gram, forme et arrangement des cellules) ainsi que la recherche de la catalase. Ensuite, les souches purifiées sont cultivées sur milieu spécifique incliné puis conservées à 4 °C de 2 à 3 mois.

Vu le nombre important des souches isolées et purifiées au cours et en fin de fabrication, nous avons procédé à l'identification biochimique de 40 souches.

Les tests choisis pour ce type d'identification ont été préconisés selon BOURGEOIS (1991), PILET *et al.* (1998), COEURET *et al.* (2003) et GUIRAUD (2003). L'identification a été entreprise d'abord par les caractères morphologiques puis physiologiques et biochimiques (Fig. 10).

III.2.3.1. Caractères morphologiques

Il est essentiel de distinguer les bactéries lactiques sphériques des bactéries cylindriques. L'examen de préparation microscopique révélé par la coloration de Gram permet de faire cette distinction.

III.2.3.2. Caractères physiologiques

a) Mobilité : Mettre en évidence l'attaque du mannitol par un changement de couleur de milieu et aussi la possibilité de mettre en évidence la mobilité du germe étudié. L'ensemencement se fait en piqûre centrale avec un fil de platine. Après incubation à 30°C pendant 48 h, la mobilité du germe se traduit par l'envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu à partir de la piqûre de l'inoculation.

b) Température de croissance : Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactique mésophiles des bactéries thermophiles. Après inoculation en milieu liquides (bouillon MRS et M17) avec une culture pure d'organisme à tester, les tubes sont incubés 07 à 10 jours à 10°C et 24 à 48 h à 45°C. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux : présence de trouble.

c) Croissance en présence de NaCl : Ce test permet de distinguer les espèces sensibles aux variations de la pression osmotique. Chacun des milieux MRS et M17 est additionné de chlorure de sodium à 4 et 6,5%. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 02 à 03 jours.

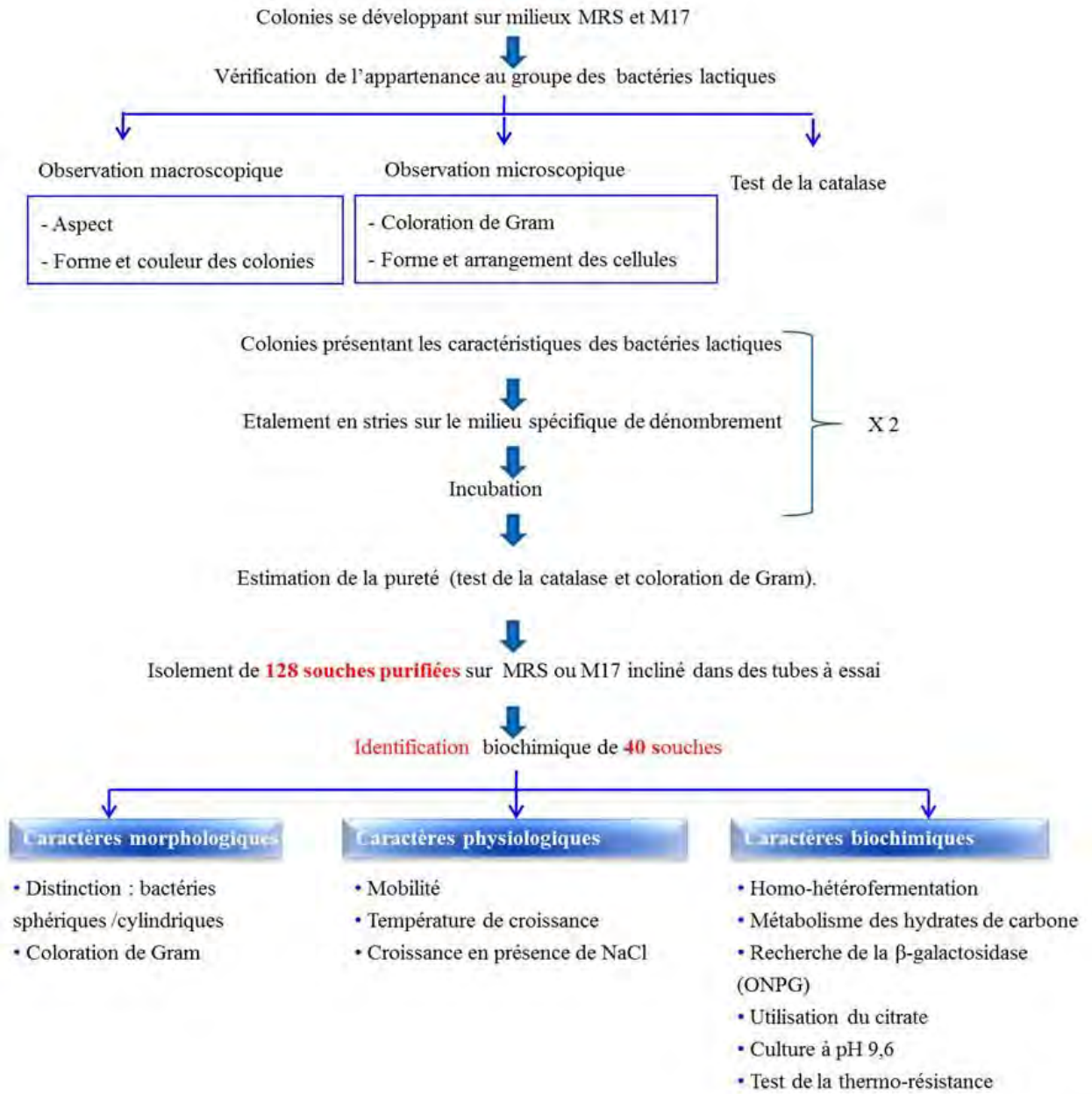


Figure 10 : Schématisation de la méthodologie d'isolement, de purification et d'identification phénotypique et biochimique des bactéries lactiques du fromage *Bouhezza*

III.2.3.3. Caractères biochimiques

a) **Homo-hétéro fermentation** : Le test permet d'apprécier le type du métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé ; il consiste à mettre en évidence la formation du gaz (CO₂). Nous avons utilisé des tubes de milieu liquide MRS et M17 dans lesquels on introduit préalablement une cloche de DURHAM qui permet la mise en évidence du gaz produit

b) Métabolisme des hydrates de carbone : Ce test permet de mettre en évidence la fermentation des sucres par les souches, en utilisant aseptiquement 10 mL d'une solution stérile des hydrates de carbone : lactose, glucose, fructose, saccharose, mannitol à 10 % puis répartie en tubes. Au moment de l'emploi, le milieu est régénéré au bain Marie. Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil de platine chargé d'une culture, puis ajouter l'huile de paraffine au-dessus du milieu. Porter les tubes à l'étuve à 37°C pendant 48 h ou plus. La production d'acide se manifeste par un virage au jaune.

c) Recherche de la B-galactosidase (ONPG) : Il s'agit d'une recherche particulière de la dégradation du lactose, souvent encore appelée recherche de la B-galactosidase ou communément test ONPG (ortho-nitro phényl-B-D galacto-pyranoside). Ce composé possède un radical B-galactosidique comme le lactose, il est incolore, une fois scindé par l'enzyme en question, il libère du galactose et de l'orthonitrophénol composé soluble jaunâtre. Les souches sont mises en suspension dans des tubes contenant quelques gouttes d'eau physiologique, un disque d'ONPG est mis dans la suspension. La coloration jaune traduit l'hydrolyse d'ONPG après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h.

d) Utilisation du citrate : Le milieu citrate de Simmons ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate, qui est un métabolite intermédiaire du métabolisme des glucides. Le citrate est le premier composé intervenant dans le cycle de KREBS et son utilisation indique le fonctionnement probable de ce cycle dans le germe étudié. Le milieu au citrate de Simmons est un milieu gélosé incliné contenant un indicateur coloré (bleu de bromothymol). L'ensemencement se fait en surface et l'incubation est à 30°C durant 24 h. Lorsque le test est positif, le milieu passe de la couleur verte à la couleur bleue.

e) Culture à pH 9,6 : Ce test permet de distinguer les souches qui développent ou non en milieu basique. Les bouillons MRS et M17 sont ajustés à pH 9,6 et les tubes sont incubés à 30°C pendant 48 h.

f) Test de la thermorésistante : Ce test permet de distinguer les souches pouvant survivre après un traitement à 60°C pendant 30 min. Après 30 min de chauffage, les tubes des milieux de MRS et M17 sont refroidis rapidement et incubés à 30°C pendant 24 à 48 h.

III.3. Caractérisation physico-chimiques et biochimiques

Les dosages effectués dans la caractérisation physicochimique du fromage *Bouhezza* sont : pH et acidité, matière sèche, matière grasse, chlorures totaux, azote totale et azote soluble et non protéique. Ensuite, un suivi de la protéolyse par électrophorèse et de la composition en lipides par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisés.

III.3.1. Détermination du pH et de l'acidité

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Hanna ; instrument 8521.model 8571n, Singapore) à 0,01 unités de précision. Pour la matière première la détermination est réalisée sur 10 mL de l'échantillon. En ce qui concerne le fromage, l'électrode du pH-mètre est placée directement dans le fromage.

L'acidité est mesurée dans le lait et *Lben* (NF V 04-205 AFNOR 1993), le fromage en degré Dornic (°D), ou en gramme d'acide lactique pour cent gramme de produit. Le titrage est réalisé par une solution alcaline (NaOH, N/9) en présence de phénolphtaléine à 1 % (p/v), (1 mL de NaOH (N/9) correspond à 0,01 g d'acide lactique pour cent). La concentration finale de l'acide dans la solution mère est ramenée en gramme d'acide lactique pour cent gramme de fromage et de matière sèche ou en degré Dornic.

Pour le dosage de l'acidité du fromage, dix g de *Bouhezza* sont homogénéisés dans 40 mL de l'eau distillée à 60°C et à faible vitesse puis compléter dans un Erlenmeyer à 100 mL avec l'eau distillée. Le mélange est centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min. Après centrifugation le surnageant est placé dans une fiole jaugée et le volume est complété à nouveau à 100 mL par l'eau distillé (BARBANO, 1986).

III.3.2. Détermination de la matière sèche et activité de l'eau

L'extrait sec total est déterminé à l'aide d'une étuve réglé à 103 ± 2 °C. Les prises d'essais sont mesurées à 1 mg près et la matière sèche est exprimée en pourcentage pondéral par le restant après dessiccation. Deux grammes de fromage sont pesés après homogénéisation de la pâte fromagère, et la matière sèche est exprimée en pourcentage pondéral par le restant après dessiccation. La dessiccation est réalisée dans une étuve GALLENKAMP-CE (serial N°= S094/09/405, UK) avec circulation d'air par une pompe à vide (KWF Newberger CE type N°= 726.3 FT.18), à une température de 103 ± 2 °C jusqu'à dessiccation complète du produit (MARSHALL, 1993).

L'activité de l'eau (a_w) a été mesurée à l'aide d'un appareil Novasina Aw Sprint (TH-500, Switzerland). Une fine couche du fromage (1mm d'épaisseur) est placée directement dans le port-échantillon de l'appareil puis lecture de la valeur (a_w) affichée.

III.3.3. Dosage de la matière grasse

Le dosage de la matière grasse du lait et du *Lben* (11 mL) est réalisé selon la méthode acido-butyrométrique de Gerber (NF V 04-210, AFNOR 1993). Cette méthode est basée sur l'attaque acide des éléments du produit (par H_2SO_4 ; $d=1,820$), excepté la matière grasse, puis centrifugation (centrifugeuse FUNKA.Gerber). La séparation de la matière grasse en couche claire et transparente est favorisée par addition d'une petite quantité d'alcool iso amylique. Le résultat est exprimé en (g/L). Pour le fromage, le dosage de matière grasse du fromage (3 g) est basé sur la **méthode de Van-Gulik** (NFV04-287, AFNOR 1993). La teneur en matière grasse du fromage est exprimée en gramme pour cent gramme de matière humide et sèche (THOULLON 1993).

III.3.4. Dosage des chlorures totaux par reste – méthode de VOLHARD

Pour déterminer la teneur des matières premières (3 g) et du fromage (2 g) en sels nous avons utilisé la méthode de VOLHARD (AUDIGIE *et al.*, 1984, FAO 1997). Cette méthode permet le dosage des chlorures totaux et le résultat est exprimé en chlorure de sodium. On procède à une minéralisation de l'échantillon par l'acide nitrique concentré et à une défécation de la matière organique qui reste (essentiellement les protéines) par le permanganate de potassium (5 % p/v). En présence d'un excès de nitrate d'argent, les chlorures de l'échantillon précipitent en chlorure d'argent. L'excès d'ions d'argent est dosé par une solution titrée de thiocyanate de potassium (0,1 N) en présence d'indicateur de fin de réaction. L'indicateur utilisé est l'alun de fer et d'ammonium. Un mL de solution de thiocyanate de potassium (0,1 N) correspond à 0,00585 g de NaCl, et la teneur en chlorure de sodium est exprimée en (gramme pour cent gramme de matière humide ou sèche).

III.3.5. Dosage de l'azote total, de l'azote soluble et de l'azote non protéique

Le dosage de l'azote est effectué par la méthode de KJELDHAL. Sous l'effet de la chaleur, l'échantillon est minéralisé dans l'acide sulfurique en présence de catalyseur. L'azote protéique et l'azote des autres constituants est convertis en sulfate d'ammonium. Le catalyseur utilisé est le mélange de sélénium, dans le cas du lait on ajoute du sulfate de potassium. L'ammoniac est distillé puis fixé dans une solution acide standard (acide borique à 4% avec l'indicateur coloré) après alcalisation du minéralisât à l'aide d'une base

forte (NaOH, 30%). Le titrage a été réalisé par l'acide chloridrique titrisol (0,1 N) en présence d'indicateur coloré « Tachiro ».

La prise d'essai dépend de l'échantillon et doit renfermer entre 0,0058 et 0,2 g d'azote. Pour apprécier la teneur en matières azotées totales la teneur en azote estimée par digestion de l'ensemble de l'échantillon est multipliée par un coefficient approprié qui est de **6,38** au lait et produits laitiers (AUDIGIE *et al.*, 1984 et FAO, 1997).

La protéolyse des fromages est souvent déterminée par le dosage de l'azote soluble à pH 4,6 (LENOIR, 1962 ; SCHMIDT *et al.*, 1982 ; MISTRY et KASPERSON, 1998 ; FENELON *et al.*, 2000 et GOROSTIZA *et al.*, 2004). L'appréciation du taux de protéolyse de *Bouhezza* a été estimée par le dosage de cette fraction d'azote dans la pâte fromagère en cours et en fin de fabrication. Le dosage concerne la fraction azotée non caséique appelée azote soluble à pH 4,6 (NS pH 4,6). Il consiste en une séparation par précipitation de la caséine au point isoélectrique des caséines et filtration ou centrifugation puis dosage de l'azote du filtrat par la méthode de KJELDHAL (SWAISGOOD, 1982).

Pour ce dosage le fromage (0,75 g) a été solubilisé dans 50 mL de solution tampon d'acide acétique (0,25 M d'acétate de sodium, 2,2 M de NaCl et 0,025 M de CaCl₂, pH 4,6) et homogénéisé pendant 30 sec puis filtré sur papier Watman (2V). Concernant la fraction d'NNP ou NS-TCA, l'échantillon de fromage (1,5 g) a été solubilisé dans 45 mL de solution d'acide trichloroacétique (12 % p/v) et homogénéisé pendant 30 sec puis filtré sur papier Watman (n° 42). Chaque filtrat a été récupéré directement dans un matras de minéralisation puis dosage de l'azote du filtrat par la méthode de KJELDHAL (BYNUM et BARBANO, 1985). Chaque analyse a été répétée deux fois. L'appareil de minéralisation est un Gerhardt Boon type K 1.16 et l'unité de distillation est un distillateur FOSS TECATOR 1002.

III.3.6. Suivi de la protéolyse par électrophorèse sur gel (UREA-PAGE)

III.3.6.1. Préparation des échantillons de fromage

Des électrophorèses monodimensionnelles (LAEMMLI, 1970) ont été réalisées sur la fraction soluble à pH 4,6. Cette analyse a concerné des échantillons du *Bouhezza* collectés de fermes et des expérimentations, à différents stades de fabrication-maturation, dans le but de mettre en évidence les différentes dégradations des caséines dans le fromage.

La fraction d'azote soluble à pH 4,6 (SN pH4,6) a été préparée comme décrit par FALLICO *et al.* (2004). Une masse de 25 g de fromage a été solubilisé dans 50 mL d'eau distillée à l'aide d'un stomacher, pendant 10 min. La précipitation des caséines à pH 4,6 a été réalisée par l'ajout d'une solution d'HCl (1N) jusqu'à stabilisation du pH à 4,6 après 30 min. Ensuite les échantillons ont été chauffés à 40°C pendant 1h puis centrifugés à 4290 rpm/30min/4°C). Le culot est repris dans l'eau distillée puis lyophilisé (Lyophilisateur de marque Christ® Alpha 1-4) pendant 36h à une pression de 0,1 mbar et à - 62°C.

III.3.6.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'Urée

(UREA-PAGE)

La séparation électrophorétique des constituants de la fraction d'NS à pH 4,6 a été réalisée sur le gel de polyacrylamide en présence d'Urée (UREA-PAGE) avec un gel de concentration de 4% (p/v) et un gel de séparation de 12 % (p/v) de polyacrylamide. Les gels ont été préparés suivant le tableau ci-dessus (Tab. 7).

Tableau 7 : Composition des gels de polyacrylamide de l'UREA-PAGE

	Gel de concentration	Gel de séparation
Solution tampon du gel de séparation	/	54,5 mL
Solution tampon du gel de concentration	45 mL	/
Solution d'acrylamide (40 %) (p/v)	5 mL	22,5 mL
Bis-Acrylamide	0,1 g	0,375
Temed	25 µL	37,5 µL
APS (persulfate d'ammonium)	300 µL	282 µL

L'analyse a été réalisée sur une unité de gel de bloc verticale IIXI Changeante (BioRad Laboratories Ltd., Watford, Herts, Royaume-Uni) selon la méthode d'ANDREW (1983). Les tampons de chaque gel sont composés par le Tris et l'urée (Tab. 8).

Tableau 8 : Composition des solutions tampons des gels de concentration et de séparation

	Tampon du gel de concentration	Tampon du gel de séparation
Tris	8,30 g	64,30 g
Urée	300 g	385,7 g
H ₂ O	Compléter à 1 L	Compléter à 1 L
pH final	7,6	8,9

Dix gramme du lyophilisat de la fraction NS à pH 4,6 ont été mélangé avec le tampon de charge (7,5 g/L Tris, 490 g/L urée, 7 mL/L du 2- mércaptoéthanol). Après homogénéisation et solubilisation complète, on ajoute 10µL du bleu de bromophénol pour colorer la solution. Ensuite 15 µL de chaque échantillon de fromage ont été placés dans le puit du gel de concentration. La détermination du poids moléculaire des différentes protéines a été effectuée à l'aide de protéines de références de caséines. Les colorations dans une solution au Bleu brillant de Coomassie G250 (Coomassie G-250bà 0,2% (p/v), H2SO4 1M, KOH 1M et TCA 12% (p/v)) ont été utilisées pour mettre en évidence les protéines dans les gels de polyacrylamide selon des modifications de la méthode de BLAKESLEY et BOEZI (1977). La décoloration des gels a été effectuée sous agitation douce pendant 1 jour dans une solution de méthanol 30 % (v/v) et d'acide acétique 7,5 % (v/v).

Les gels ont été soumis initialement à une intensité de courant constante de 280V durant 20 min, jusqu'à ce que le front de migration, marqué par le bleu de Bromophénol, ait parcouru la hauteur du gel. Ensuite, l'intensité du courant est augmentée à 300 V pendant 16h à 12°C. Un réfrigérant intégré avec le système assure le refroidissement en continue (Julabo F256HL). L'identification des différentes bandes retrouvées après décoloration a été faite en comparaison avec les bandes du marquer et de la bibliographie.

III.3.7. Composition en acide gras du *Bouhezza* par CPG/MS

Cette partie est une initiation de l'étude de la fraction lipidique du *Bouhezza*. Elle vise la composition globale en acides gras du fromage au cours de la fabrication. Cette partie a été complétée par l'étude de BELBELDI (2013) sur des fromages de fermes.

Pour les fromages de fabrications contrôlées, 3 échantillons répartis sur la durée d'affinage de deux fabrications simultanés ont été analysés. L'analyse a concerné donc le *Lben* et le fromage *Bouhezza* à 7j, 15j et 43j de fabrication. La détermination concerne les acides gras sous forme d'esters méthylés par CPG/MS. La préparation des échantillons et les conditions d'expérimentations sont les suivants.

III.3.7.1. Extraction de la matière grasse des échantillons

Elle comporte les étapes suivantes :

- Dissolution complète de 10 g de fromage dans l'eau distillée (90 ml) ;
- Centrifugation à 3000 g à 40 °C pendant 30 min et récupération de la phase lipidique ;

- Stabilisation thermique pendant une heure dans un bain marie à 45 °C puis centrifugation à 3000 g pendant 5 min.

Concernant le Lben, la matière grasse est récupérée par simple filtration puis stabilisation thermique et centrifugation.

III.3.7.2. Méthylation

La méthylation des acides gras est faite comme suite :

- Action de 200 uL de la matière grasse avec 750 uL d'hexane et 200 uL d'une solution de KOH (2N dans le méthanol) et agitation au vortex pendant 2 min ;
- Centrifugation à 5000 tours pendant 5 min puis récupération de la phase supérieure (phase grasse) ;
- Élimination des traces d'eau par double passage de l'échantillon dans une colonne remplie du Na₂SO₄.

La fraction lipidique ainsi préparée est prête pour l'injection dans la CPG.

III.3.7. Conditions de la CPG

Le volume injecté dans la colonne est de 0,5 uL ; la température de la colonne est amenée de 40 °C à 280 °C avec une vitesse de 5°C/min et l'injecteur et le détecteur sont maintenus à 280 °C. Le débit du gaz vecteur (He) est de 1 mL/min). Le mode d'injection Split est avec un ratio de 1: 55. La GC (chromatographe HP 5890) couplé à un spectromètre de masse HP 5973 (Hewlett Packard, Amsterdam, Hollande). La phase stationnaire est apolaire (HP 5 MS) 5% diphenyl et 95% diméthylpolysilixane, de 60 m x 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film.

III.4. Analyse du profil aromatique

III.4.1. Origine et préparation des échantillons de *Bouhezza*

Dans cette partie l'analyse a concerné les différents échantillons du fromage *Bouhezza* prélevés durant la fabrication contrôlée de dix semaines. Aussi, cette fabrication a été comparée avec quatre échantillons de fermes (F1et F2 affinés à 75j ; F3 et F4 affinés à 150 j) aux laits de vache. Ces échantillons ont été collectés de fermes situés dans la zone rurale d'Ain Fakroun (wilaya d'Oum El Bouaghi) et fabriqués pour l'autoconsommation.

En vue de leurs analyses, les échantillons du fromage *Bouhezza* conservés à (-20°C) ont été décongelés au réfrigérateur une nuit puis maintenus au moins une heure à température ambiante. Pour l'analyse des constituants d'arôme par le nez électronique « Smart Nose », l'échantillon de fromage de 4 g a été pesé à une précision de 1mg et placé directement dans des flacons de 20-mL, adapté à l'auto-échantillonneur de Copain Combi, scellés avec une cloison butyl/PTFE et un couvercle. D'autre part, et en vue de l'extraction dynamique et statique par head-space, 3 g de fromage sont pesés et finement dispersés dans 30 mL d'eau MilliQ. L'homogénéisation est faite à l'aide d'un Ultraturax (Heidolph DIAX 900) à 1 % de force pendant 30 secondes. Ceci constituera notre solution de fromage pour l'extraction des composés volatils

III.4.2. Extraction des composés volatiles par headspace

L'extraction des composés volatiles est réalisée selon le principe de l'espace de tête ou « headspace » selon deux systèmes différents : le système dynamique Purge and Trap, et le système statique Microextraction de Phase Solide (SPME).

III.4.2.1. Extraction dynamique headspace (DHS) par Purge and Trap

Pour l'extraction et l'injection des composants volatils, nous avons utilisés une purge dynamique de headspace et un appareil de piège (Tekmar 8900) (Fig. 11).



Figure 11 : Système d'extraction dynamique de headspace (DHS) par Purge and Trap

Deux mL de la solution du fromage dilué ont été placés dans un pulvérisateur en forme de « U », et chauffé à 40°C. Les composés volatils ont été concentrés dans un piège de Tenax (adsorbant de l'aiguille du headspace), maintenu à 40 °C. La purge des composés piégés a été réalisée avec l' N_2 (débit de 10 mL min⁻¹), avec 1min de pré-purge, une purge chaque minute pendant 10 min de purge, et un temps de purge sec d'une minute. Le piège humide, la ligne de transfert de l'extrait vers la GC/MS, et la valve (à 6 ports) ont été maintenus à 270 °C. Les composés volatils étaient désorbés du Tenax à 230 °C pendant

4 min. Après l'injection automatique dans la GC/SM, le piège a été maintenu à 230°C pendant 7 min.

La méthode d'extraction Purge & Trape a été utilisée pour l'analyse par GC/MS/Olfactométrie. Ceci, pour déterminer les composés odorants actifs dans le fromage *Bouhezza* et leur évolution ou changement durant la période de fabrication-maturation (10 semaines).

III.4.2.2. Extraction statique headspace par SPME (Solide Phase Micro Extraction)

Le principe de cette technique repose sur le piégeage des Composés Organiques Volatils (VOCs) de l'espace de tête de l'échantillon sur l'adsorbant solide de la seringue de la Micro Extraction de Phase Solide (SPME) du système statique de headspace. Ensuite, les VOCs seront extraits thermiquement.

Deux mL de la solution du fromage dilué ont été placés dans un flacon de 22 mL puis scellés et placés dans un bain Marie à 37°C pendant 30 min. Ensuite, la seringue de la SPME a été installée dans le flacon. L'extraction statique en HS-SPME nécessite une exposition de la fibre de la seringue de SPME durant 30 min (Fig. 12).



Figure 12 : Système d'extraction par head space statique SPME

La fibre de la seringue de SPME est garnie avec une couche de Divinylbenzen/ Carboxen/ polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 µm d'épaisseur (Supelco, Bellefonte, PA, Etats-Unis). Avant utilisation, la fibre a été initialement pré-conditionnée en l'insérant dans le port d'injection de la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) pendant 1 h à 225 °C et a été reconditionnée à nouveau entre les différentes extractions pendant 5 min à la même température suivie par un refroidissement à température ambiante durant 10 min. La désorption des COVs concentrés est réalisée thermiquement en

insérant l'aiguille le plus profondément possible dans l'injecteur chaud du chromatographe.

La méthode de SPME a été utilisée pour définir et comparer le profil aromatique des fromages collectés de fermes et ceux de la fabrication contrôlée. Aussi, elle a été utilisée pour étudier l'évolution des composés aromatique aux cours de la fabrication-maturation du fromage *Bouhezza* sur une durée de dix semaines.

III.4.3. Analyse par le nez électronique ou SMart Nose

III.4.3.1. Instrument et conditions d'analyse

L'analyse de **SMart Nose** a été effectuée avec un nez électronique, le système de Nez intelligent « SMart Nose system » permet l'analyse directe par SM des composants organiques volatils (VOCs) d'un échantillon liquide ou solide sans séparation des composants comme dans la méthode de headspace (Fig. 13). Le traitement des résultats permet de détecter des différences ou des ressemblances entre les échantillons.



Figure 13 : Système du Nez intelligent « SMart Nose system »

Le système de Smart Nose (de LDZ, CH-2074 Marin-Epagnier) incorpore l'auto-échantillonneur de Copain Combi CTC Analytics AG (CTC Combi le Copain avec le logiciel de Compositeur de Cycle), un spectromètre de masse quadripôle de haute sensibilité (Inficon AG) avec une détection massive ionique aux limites de 1 à 200 amu et un logiciel d'analyse multivariable convivial (SMart Nose 1.51) pour l'acquisition de données. Quatre grammes du fromage "*Bouhezza*" étaient pesés et placés dans des flacons de 20-mL (adapté à l'auto-échantillonneur de Copain Combi) scellés avec une cloison butyl/PTFE et un couvercle. Les échantillons ont été aléatoirement placés dans les plateaux d'échantillonneur automatique pour prévenir leurs déplacements en raison des facteurs externes. Trois répétitions ont été mesurées pour chaque échantillon. Les principales

conditions de fonctionnement étaient : température d'incubation à 60 °C; temps d'incubation de 30 min; volume d'injection de 2,5 mL ; température de seringue à 100°C ; température d'injecteur à 160°C; azote comme gaz de purge, avec un flux de purge de 200 mL min⁻¹ ; mode d'ionisation EI à 70 eV; vitesse de balayage de spectromètre massive de 0,5 s/mass; gamme massive de 10-160 amu; SEM tension à 1540. Le temps d'acquisition total a été mis à 170 sec pour que trois cycles aient été mesurés pour chaque injection.

III.4.3.2. Traitement de données et analyse statistique

Pour les résultats de SMart Nose, le traitement des résultats a été accompli par le logiciel d'analyse intégré avec le dispositif de SMart Nose. Premièrement, la valeur moyenne des trois cycles a été calculée, générant un spectre unique de masse moyenne pour chaque injection. Ensuite, chaque spectre a été normalisé par l'enregistreur de l'intensité m/z de masse 40 amu, en provenance de l'argon de l'air au-dessus de l'échantillon pris ici comme référence interne. Le rapport m / z de l'argon utilisé est optimal pour la normalisation de données en raison de l'absence de contamination par d'autres composés et la concentration constante de l'argon dans l'espace de tête. Une étude de la variance des données normalisées entre les groupes de différents échantillons permet de sélectionner les ions les plus discriminants qui seront utilisés pour le calcul de l'Analyse en Composant Principal (ACP). Une telle normalisation permet de corriger la dérive qu'elle soit dans une seule série de mesures et dans différentes séries.

III.4.4. Analyse par CPG avec la détection de masse sélective (SPME, GC/MS)

Pour l'analyse et l'identification des composés volatils, extraits par SPME, nous avons utilisé un appareil de chromatographie gazeuse- Agilent 7890A Series GC system (NY, USA) couplé avec Détecteur Sélectif de Masse (NY, USA) (triple axe). Le fractionnement des composants volatiles a été fait dans une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de l'épaisseur de film, Agilent des Technologies, des Etats-Unis). Les conditions de la chromatographie étaient comme suit : injecteur split/splitless à 220°C; conditions de programme du four : 35°C pendant 3 min, 6°C/min jusqu'à 200°C, 30°C/min jusqu'à 240°C pendant 3 min.

La pression du gaz vecteur (He) a été fixée à 13,6 psi et le débit du gaz était de 1,0 mL/min. Le détecteur sélectif de masse fonctionne en mode de balayage, 5,15 scan/s, avec 70 eV. L'identification des pics a été effectuée en comparaison des spectres massifs avec

les données bibliographiques de la base de données Wiley 175 (Wiley and Sons, Inc., Allemagne) et avec les index de rétention linéaires (LRI) de standards authentiques (Sigma-Aldrich) calculé après écoulement d'une série de paraffine (de C5 à C20) sous les mêmes conditions de travail.

III.4.5. Analyse par CPG couplée à l'Olfactométrie avec la détection de masse sélective (Purge & Trape, GC/MS/O)

Pour l'analyse et l'identification des composés volatils, extraits par Purge & Trape, nous avons utilisé un appareil de chromatographie gazeuse-olfactometrie (GC HP, Série 6890) couplé avec Détecteur Sélectif de Masse (MSD HP 5973) (Fig. 14).

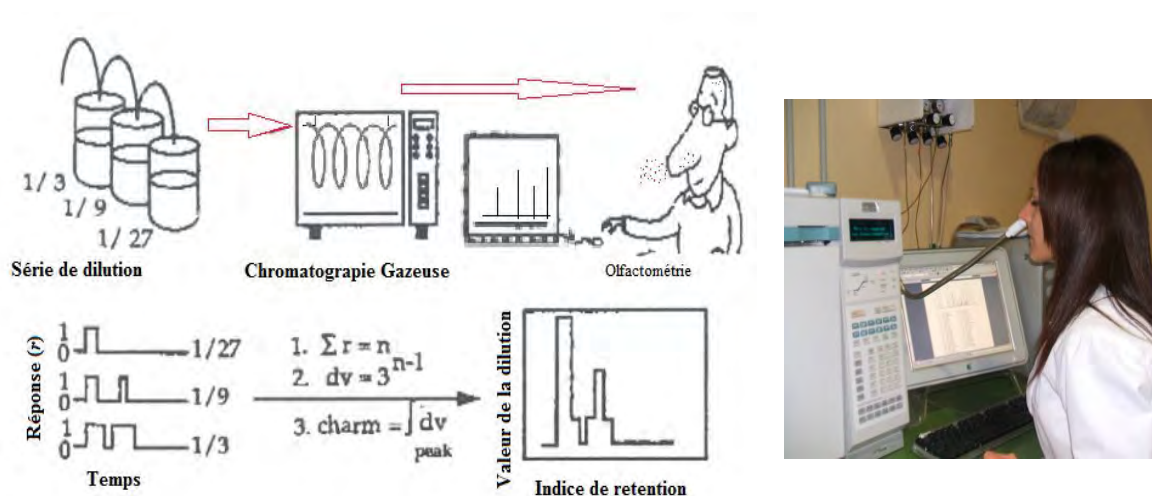


Figure 14 : Description de la détection des composants odorants par le nez humain
Olfactométrie et GC/MS

Le fractionnement des composants volatiles a été fait dans une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de l'épaisseur de film, Agilent des Technologies, des Etats-Unis). Les conditions de la chromatographie étaient comme suit : injecteur split/splitless à 220°C ; conditions de programme du four : 35 °C pendant 3 min, 6°C/min. jusqu'à 200°C, 30°C/min jusqu'à 240°C pendant 3 min. La pression du gaz vecteur (He) a été fixée à 13,6 psi et le débit du gaz était de 1,0 mL/min.

Le détecteur sélectif de masse fonctionne en mode de balayage, 5,15 scan/s, avec 70 eV. L'identification des pics a été effectuée en comparaison des spectres massifs avec les données bibliographiques de la base de données Wiley 175 (Wiley and Sons, Inc., Allemagne) et avec les index de rétention linéaires (LRI) de standards authentiques

(Sigma-Aldrich) calculé après écoulement d'une série de paraffine (de C₅ à C₂₀) sous les mêmes conditions de travail.

La reconnaissance de l'odeur des composés odorants actifs (COAs) a été réalisée en utilisant la seule méthode de reniflement où le renifleur a été entraîné avec un groupe de composés standard conçus pour la sélection de sujet de GC/O (MARIN *et al.*, 1988).

Les standards ont été constitués par un groupe de huit composés pour évaluer l'acuité olfactive et pour déterminer si le renifleur présente une anosmie spécifique pour certaines odeurs. Le renifleur n'avait aucune anosmie spécifique pour ces standards. Les composés élués ont été mélangés avec un flux d'air humidifié selon la méthode décrite par ACREE et BARNARD (1994) et le renifleur a été continuellement exposé à ce flux pendant 30 min. Le renifleur décrit l'odeur perçue et sa durée (ACREE *et al.* 1976). Le temps de réponse aux odeurs individuelles perçues par le renifleur a été enregistré par le logiciel Charmware (v.1.12, Datu, Inc. Genève NEW YORK).

Les temps de réponse des différentes odeurs perçues ont été convertis en Indices de Rétention (IR) pour chaque COAs et montré par le logiciel comme une série de pics dans un "aromagram". Les valeurs de RI ont été calculé relativement à une série d'alcanes normal (C₇ à C₁₈) précédemment injecté dans le port du même GC/MS.

III.5. Caractérisation de la texture et structure du fromage *Bouhezza*

III.5.1. Evolution de la fermeté du fromage par test de pénétration

L'évolution de la fermeté du fromage au cours du temps a été réalisée à l'aide d'un pénétromètre de type « pétro test ». Cet appareil permet la mesure du degré de pénétration verticale d'un corps plongeant présentant la forme d'une aiguille conique et d'un poids de 15 g pendant un temps de 5 sec dans l'échantillon d'analyse à température ambiante.

L'analyse consiste à faire descendre le corps plongeant jusqu'à ce que la pointe du cône de pénétration touche la surface de l'échantillon. Le corps plongeant est ensuite libéré à l'aide d'un interrupteur électromagnétique et pénètre librement dans l'échantillon pendant un temps fixé. La profondeur de pénétration mesurée dépend de la texture et de la fermeté du produit. Le corps plongeant utilisé dans cette partie est un "cône spécial Plexiglas 15g" de 48 mm de hauteur, spécifique aux fromages.

III.5.2. Analyse du Profil de la Texture (TPA)

L'analyse de la TPA permet de mesurer différentes caractéristiques d'un échantillon (Fig. 15). L'objectif de cette analyse est de quantifier le changement des propriétés texturales du fromage à partir de trois semaines d'âge. Avant cette période, le caillé du fromage n'a pas encore pris forme et son humidité est assez élevée (aspect d'un liquide concentré). Il ne convient pas à ce type d'analyse.

Au cours de cette analyse, trois échantillons du fromage *Bouhezza* ont été placés dans des boîtes de 35 mm de diamètre et 20 mm de hauteur. Avant l'analyse les échantillons ont été retenus à 20 °C pendant une heure. L'analyse de TPA a été effectuée par un texturomètre TA *Plus* de LLOYD INSTRUMENTS (AMETEK, France).

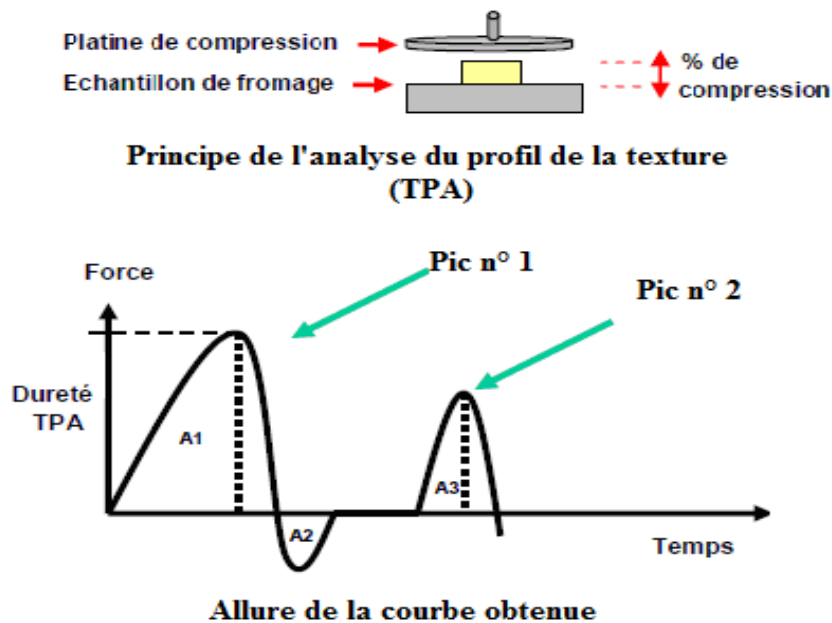


Figure 15 : Principe et grandeur calculés dans l'analyse de profil de texture

La dureté : force nécessaire pour la déformation imposée (pic de force n° 1) ;

L'adhésivité : travail nécessaire pour décoller l'échantillon de la sonde (l'aire A2) ;

L'élasticité : capacité nécessaire pour que l'échantillon retrouve sa forme initiale (rapport de force : pic n°2/pic n°1) ;

La cohésion : degré auquel l'échantillon se déforme avant la rupture (rapport d'aires A3/A1).

Un échantillon de fromage est comprimé à 50% puis relâché sur deux cycles pour simuler la mastication. Après la première déformation la sonde cylindrique de 25 mm de

diamètre est retirée, puis ré-enfoncée jusqu'à la même profondeur que lors du premier cycle. Les deux cycles sont mesurés, et grâce au logiciel NEXYGEN on obtient les valeurs de différentes caractéristiques dont le tracé est réalisé selon la force par rapport au temps (Fig. 15). Les forces maximales enregistrées lors des compressions successives ainsi que les aires sous les courbes de forces permettent de calculer différentes grandeurs pouvant être mises en relation avec des descripteurs de texture tels que la dureté, le collant, l'élasticité et la cohésion du produit.

III.5.3. Suivi des propriétés rhéologiques du *Bouhezza*

Les mesures rhéologiques ont été conduites sur un rhéomètre et un rhéoviscosimètre informatisés. Le rhéomètre est un StressTech Reologica (Reologica Instruments AB, Lund, Suède) fonctionnant à $20^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ et avec un système de mesure à cylindres coaxiaux (diamètres 25 et 27 mm). Les courbes d'écoulement ont été obtenues à une vitesse de cisaillement allant de 1 à 200 s^{-1} (gradient obtenu en 20 min). Le module de conservation et la tangente de l'angle de perte sont mesurés à une fréquence de 1 Hz et dans le domaine de viscoélasticité linéaire (déformation $< 2 \%$).

Le rhéoviscosimètre utilisé est de marque HAAKE VT 550. Pour le *Lben* l'échantillon à analyser (30 mL) est cisailé entre deux cylindres coaxiaux MVDIN spécifique aux produits à viscosité légère ; par contre pour les échantillons de fromage (10 g), le cisaillement est effectué entre deux cylindres coaxiaux type HV1DIN pour produit à viscosité moyenne, ou peu élevée. L'origine du cisaillement est le mouvement du rotor interne de l'appareil. Le viscosimètre est piloté par un ordinateur muni d'un logiciel d'analyse VT1.x0s550. La température de l'échantillon est maintenue à $20^{\circ}\text{C} (\pm 0,3^{\circ}\text{C})$ pendant toute la durée de la mesure grâce à un bain thermostaté (HAAKE K115).

Chaque échantillon est cisailé avec un gradient de vitesse de cisaillement et avec mesure de la contrainte de cisaillement et de la viscosité (η) qui en résulte en fonction du temps.

III.5.3.1. Courbe d'écoulement

Pour toutes les mesures nous avons travaillé avec un gradient de cisaillement qui passe de $0,1 \text{ sec}^{-1}$ à 200 sec^{-1} pendant 180 sec à une température de 20°C . Les résultats seront exprimés par la courbe moyenne de trois répétitions pour chaque échantillon.

III.5.3.2. Evolution de la viscosité

Le but de cette étude est de suivre l'évolution de la viscosité apparente du fromage *Bouhezza* au cours du temps (10 semaines). Pour cela, des mesures de la viscosité à l'aide d'un rhéomètre sont effectuées sur les matières premières et sur les échantillons de fromage *Bouhezza* prélevés aux différents stades de fabrication. Le temps global de la mesure est de 180 sec et le gradient final de cisaillement est de 1000 sec^{-1} . L'expression des résultats est donnée par une courbe moyenne issue de 3 répétitions.

III.5.4. Caractérisation de la microstructure

L'objectif de cette analyse est de visualiser la microstructure de la pâte fromagère de *Bouhezza* au cours de la fabrication par observation sous différents microscopes. Nous avons utilisé deux types de microscopes électronique : le Microscope électronique à balayage (MEB) et la Microscopie électronique environnementale (MEBE). Le Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL) a été aussi utilisé pour visualiser la distribution des glucides et des lipides dans la matrice protéique du fromage.

Ces microscopes ont été aussi utilisés dans l'étude de la microstructure de la *Chekoua* de *Bouhezza*.

III.5.4.1. Observation au Microscope Electronique à Balayage (MEB)

La préparation des échantillons de fromage et des matières premières en vue de l'observation de leur microstructure par le MEB a été réalisé selon ATTIA *et al.* (1991), les étapes sont schématisées dans la figure 16.

La préparation repose sur la fixation d'une fine couche de l'échantillon sur un support inerte, ensuite séchage par le gluteraldéhyde puis déshydratation par une série d'alcool et ensuite séchage au point critique par CO_2 et métallisation par l'or.

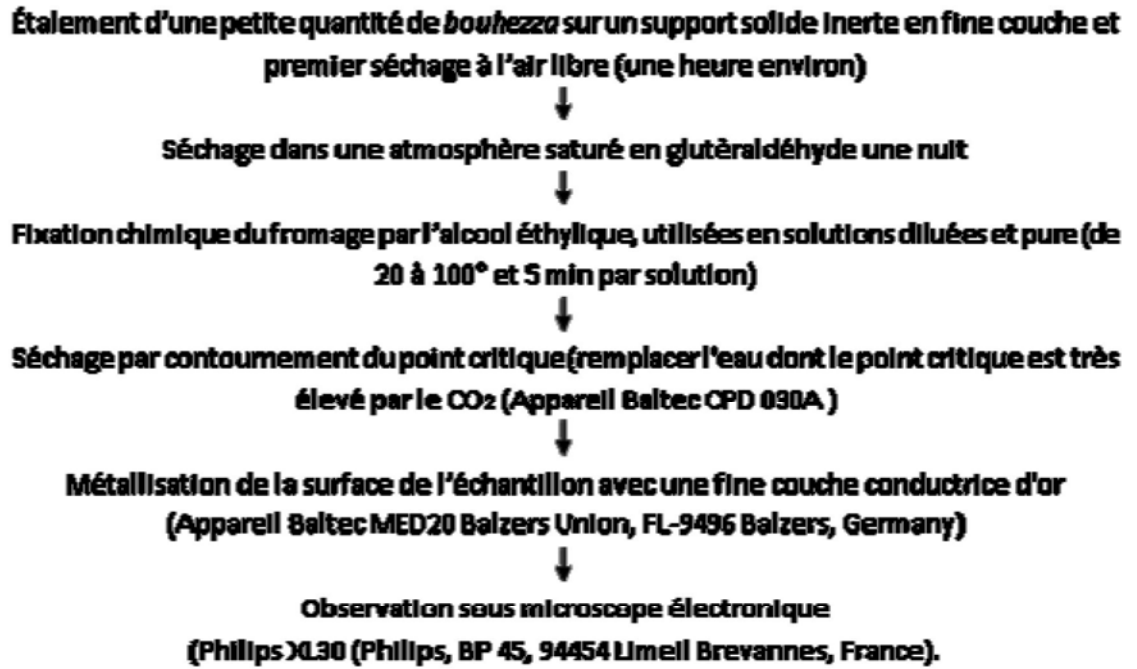


Figure 16 : Etapes de préparation des échantillons en vue de l'observation sous MEB

III.5.4.2. Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnementale (MEBE)

La Microscopie électronique environnementale (ESEM -Environmental Scanning Electronic Microscope) offre la possibilité d'observer les différents échantillons sans aucune préparation préalable et sous pression (AUTY, 2011). Les échantillons du *Bouhezza* et du *Lben* sont examinés sous pression (5 torr) et à 1 °C.

Pour la mise en évidence des perforations de la *Chekoua* à travers lesquelles se réalise l'égouttage, un morceau de la face interne (2 x 1 cm) de la *Chekoua* humidifiée a été observé à température ambiante. Les observations sont effectuées par un microscope électronique FEI quanta 200 (www.Feico.com ou www.feicompany.com) au service commun d'analyses du centre de recherches et de technologies de l'énergie Technopole (Borj Cedria-Tunis, Tunisie).

III.5.4.3. Observation au Microscope Confocal à balayage laser (MCBL)

L'analyse par Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL) permet d'étudier la viabilité et la répartition des cellules bactériennes dans les différents échantillons (*Bouhezza* ou *Chekoua*), la microstructure de la *Chekoua*, et aussi de visualiser la

répartition des différents constituants du fromage, glucides et lipides, dans la matrice protéique.

Les échantillons ont été analysés avec un microscope confocal spectral NIKON C1-Si TE2000E inversé et motorisé (Champigny- sur –Marne, France). L'analyse a été réalisée au CORFILAC, Ragusa, Italie.

A) Préparation des sondes fluorescentes

Le BACLIGHT (Live/Dead) et le CONCANAVALIN ALEXA FLUOR 633 sont les deux sondes fluorescentes utilisées pour le marquage des bactéries. Le BACLIGHT (Live/Dead) est constitué de *syto9* et de *Propidium iodide*, le premier donne une coloration verte aux cellules vivantes et le deuxième donne une coloration rouge aux cellules mortes. L'idéal est de travailler à l'obscurité et à températures ambiante parce que les colorants sont très sensibles à la lumière.

- **Préparation des sondes fluorescentes du BAC LIGHT (live/dead) (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit)** : Le contenu d'un tube de *syto9* (Live-dead Invitrogen L13152, Cergy-Pontoise, France) et l'autre de *Propidium Iodide* ont été additionnés chacun à 2,5mL d'eau deionisée. La quantité nécessaire pour la coloration a été prélevée et le reste a été divisé dans des tubes de PCR et stocké à -20°C.

- **Préparation des sondes fluorescentes du CONCANAVALIN ALEXA FLUOR 633 (Invitrogen 21402)** : un mg de Concanavalin Alexa Fluor 633 a été dilué dans 5mL de solution NaHCO₃. La solution de NaHCO₃ est préparée par ajout de 0,042g de NaHCO₃ dans 5 mL d'H₂O. La solution est divisée en petites quantité dans des aliquotes et stockée à (-20°C).

B) Coloration des échantillons (Bouhezza et Chekoua)

L'échantillon de *Bouhezza* à 10 semaines d'âge a été monté sur la lame du microscope et directement colorées avec 10 uL de rouge Nil 0,0025 % dans de l'acétone et de 10 ul de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) 0,002 % dans de l'acétone pour détecter des lipides et des protéines, respectivement. Après incubation pendant 15 min à l'obscurité, les échantillons ont été observés avec le système du microscope confocal spectral NIKON C1-Si TE2000E inversé et en utilisant les objectifs d'agrandissement de X10 et X20. L'excitation fluorescente des protéines et des lipides a été menée avec la ligne 488 nm de 40 mW Argon Ion Melles Griot laser et la ligne 543 nm à partir d'un He / Ne 2,0 mW Melles Griot Laser, respectivement. Leurs longueurs d'onde

d'émission étaient de 520 nm et 640 nm, respectivement. Les images ont été acquises avec un PMT multi-anode et contrôlés par Nikon EZ-C1 logiciel version 3.0.

Pour la viabilité des cellules, l'échantillon a été directement coloré avec les sondes fluorescentes sur les lames du microscope confocal. L'échantillon est coloré d'abord avec 15 µl de BacLight LIVE/DEAD, kit de viabilité bactérienne, puis incubé à l'obscurité pendant 15 minutes. Ensuite, il est coloré avec 15µl du Concanavalin Alexa Fluor 633 1% à 0,1M NaHCO₃ et on le laisse reposer 15 minutes. Après chaque coloration l'échantillon a été rincé à l'obscurité.

C) Observation

Les images ont été prises à un grossissement de et X10 et X20 pour le *Bouhezza* et X60 pour les peaux de chèvre. Une barre de dimension est utilisée pour identifier la cellule bactérienne. Au cours des observations, l'échantillon peut se déplacer ce qui rend la mise au point difficile.

III.6. Analyse sensorielle du fromage *Bouhezza*

L'objectif de cette analyse consiste à donner le profil sensoriel global du fromage traditionnel *Bouhezza* fabriqué avec un jury de dégustateur. Cette analyse décrit les caractéristiques sensorielles du fromage soit l'aspect et la texture, l'odeur, l'arôme, les sensations trigéminales, l'arrière-goût et la persistance du goût du fromage (BERODIER *et al.*, 2003). En premier lieu une détermination des familles ou descripteurs sensoriels du fromage *Bouhezza* a été établie avec un jury d'experts ainsi qu'un questionnaire type. Ensuite, des analyses sensorielles proprement dite ont été réalisés avec un jury entraîné.

III.6.1. Détermination des familles ou descripteurs sensorielles du *Bouhezza*

L'ensemble des familles d'odeurs et d'arômes ainsi que les saveurs ont été établies dans un atelier de discussion avec un jury de spécialiste dans l'analyse des fromages au niveau du laboratoire d'analyse sensorielle du CoRFiLac. Le principe consiste à présenter à l'expert un échantillon de *Bouhezza* affiné qu'il va renifler plusieurs fois pour détecter les odeurs reconnus puis discussion. Ensuite, l'expert déguste l'échantillon du fromage et note progressivement les familles ou les descripteurs d'arômes détectés. Les descripteurs donnés par l'ensemble des membres du jury sont retenus pour l'analyse sensorielle.

On ce qui concerne l'aspect, les sensations trigéminales, l'arrière-goût et la persistance du goût du fromage des questions directe ont été données aux dégustateurs pour l'évaluation. Cependant, la texture du fromage est évaluée par test de notation.

III.6.2. Evaluation sensorielle du fromage *Bouhezza*

Le groupe d'examineur est constitué d'un jury entraîné à l'analyse (12 sujets) des fromages. La première étape consistée à une description des principales caractéristiques sensorielles du fromage puis à leur donnée une note. Les tests sont menés selon les directives de la norme V09-001(AFNOR, 1995).

L'analyse consiste à présenter à un dégustateur un échantillon du fromage *Bouhezza* affiné (à 70 j épicé et non épicé). Les caractéristiques sensorielles du *Bouhezza* sont évaluées par des observations visuelles et des dégustations. Le bulletin de réponse de cette épreuve est présenté en annexe V.

III.7. Caractérisation de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza*

Cette dernière partie d'étude vise un complément de caractérisation du fromage traditionnel *Bouhezza* en étudiant quelques caractéristiques de son contenant, l'outre nommée selon nos familles enquêtées par « *Chekoua* » ou même « *Djeld* ». La peau de chèvre implique naturellement une grande diversité génétique de sa flore microbienne. Cette flore naturelle ou indigène reste encore très mal connue et non valorisée dans l'affinage du fromage. La *Chekoua* joue cependant plusieurs rôles importants durant la fabrication de notre fromage et agit comme un contenant actif durant la fabrication-affinage.

La caractérisation de la *Chekoua* a été entreprise par des analyses microbiologiques et par imagerie. Comme précédemment mentionnée, la peau de chèvre traitée peut être nouée et utilisée. Avant la fabrication du fromage, un volume de *Lben* est introduit dans la *Chekoua* et est laissé toute une nuit. Le lendemain, ce *Lben* est éliminé et la *Chekoua* est bien rincée à nouveau avec de l'eau. A ce moment, la fabrication du *Bouhezza* commence avec un premier ajout du *Lben* salé. Notre expérimentation se résume dans les étapes suivantes :

1. Préparation selon le procédé traditionnel de deux peaux de chèvre sous forme de *Chekoua* ;

2. Caractérisation microbiologique de la *Chekoua* après son traitement avec du sel et du genièvre et après un dernier rinçage avec du *Lben* comme décrit dans le procédé traditionnel ;
3. Caractérisation microscopique de la surface de la *Chekoua*, qui sera en contacte directe avec le fromage, avant et après rinçage avec le *Lben*.

III.7.1. Matériel et méthodes de confection de la *Chekoua*

III.7.1.1. Peaux de chèvre et préparation de la *Chekoua*

Deux peaux entières de chèvre, âgées respectivement de 6 à 8 mois ont été récupérés après abattage de la ville d'Ain Fakroun (Oum El Bouaghi). Elles ont été utilisées pour la confection de deux *Chekouates*.

III.7.1.2. Méthode de préparation de la *Chekoua*

La préparation et le traitement des peaux entières sont réalisés selon le procédé traditionnel adopté selon les résultats d'enquête. Cette préparation a été décrite dans le paragraphe I.2.2.1. Matières et matériel des fabrications contrôlées, partie Matériel et Méthodes et illustrée en figures 7 et 8.

III.7.2. Caractérisation microbiologique de la *Chekoua* et du *Lben* de rinçage

L'analyse microbiologique a été réalisée selon deux approches : la première consiste à un dénombrement des principaux groupes microbiens sur des milieux sélectifs et la deuxième visant l'accès à l'identification de l'écosystème microbien à l'aide de la technique de la biologie moléculaire PCR-TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*).

III.7.2.1. Echantillons de la *Chekoua* et du *Lben*

Des analyses microbiologiques ont été réalisées sur les biofilms des peaux (PF1 et PF2) juste après préparation et aussi après rinçage au *Lben*. Le biofilm de chaque peau a été prélevé en respectant les conditions d'asepsie avec trois écouvillons humidifiés d'eau peptonée en frottant trois zones différentes de la peau. Chaque zone est d'une aire de 100 cm² délimitée avec un carré en plastique préalablement stérilisé sous UV dans une hotte à flux d'air laminaire (Fig. 17).

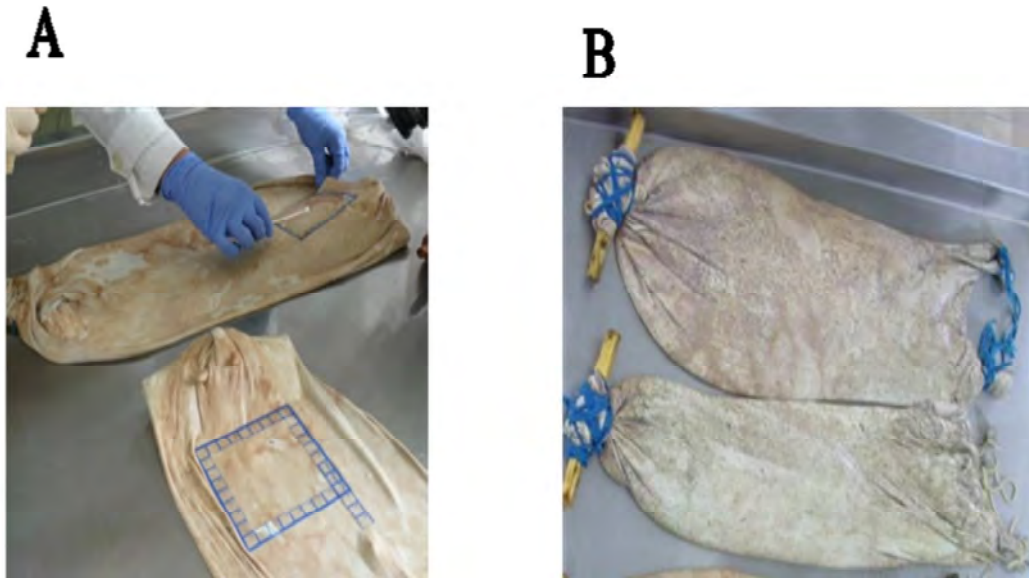


Figure 17 : *Chekoua* de *Bouhezza*. Prélèvement du biofilm (A), *Chekoua* avec du *Lben* pendant une nuit (B)

D'autre part le *Lben* préparé selon le procédé traditionnel a fait l'objet d'analyses avant contact avec les outres (*Lb0*) et aussi après contact de 10 min et de 16 h (*Lb 10 min* et *Lb 16 h* soit une nuit de contact). Soixante-dix millilitres de *Lben* ont été prélevés chaque fois pour l'analyse microbiologique et 40ml pour l'identification par la PCR-TTGE.

III.7.2.2. Flores recherchées et identification par la PCR-TTGE

Les flores microbiennes dénombrées sont les suivantes : flore totale aérobie mésophile (FTAM), flore lactique (lactobacille et lactocoque), levures et moisissures, entérobactéries et *Staphylococcus aureus*. Les méthodes de dénombrement ont été décrites précédemment dans le paragraphe III.2.1. Méthodes de dénombrements des flores microbiennes. En parallèle à ces dénombrements une identification complémentaire a été réalisée par la PCR-TTGE. Les détails de cette technique ont été donnés dans cette partie, Matériel et Méthodes, paragraphe III.2.2. Méthodes d'identification génétiques par la PCR-TTGE.

II.7.3. Caractérisation microscopique de la *Chekoua*

L'observation de la microstructure de la surface de la *Chekoua* de *Bouhezza* a été réalisée sous microscopes. Nous avons utilisé trois types de microscopes : le Microscopie électronique environnementale (MEBE), le Microscope électronique à balayage (MEB) et. Le Microscope Confocal à balayage laser (MCBL). Les techniques ont été déjà décrites en paragraphe I.6.4. Caractérisation de la microstructure.

Pour l'observation au MEB, l'analyse a été menée comme décrit par LORTAL *et al.* (2009). Après prélèvement, deux échantillons de peau de chèvre (avant et après contact avec *Lben*) ont été mis dans une série de solutions d'éthanol à gradient de concentration (75, 85, 95 et 100%) et à une température ambiante pendant 12 h par concentration. Ils ont été séchés au point critique dans le CO₂ liquide (31,1°C, 72,9 atmosphère) en utilisant le Polaron CPD 7501 (Polaron, Watford, UK). La pression et la température sont progressivement élevées jusqu'à ce que la solution soit supercritique et le CO₂ liquide se transforme en gaz sans endommager les tissus. Les échantillons ont été maintenus dans un dessiccateur, puis enrobés par pulvérisation de la poudre métallique (or- palladium) pour faciliter la conduction des électrons lors de l'observation avec MEB. Les échantillons ont été analysés avec un MEB (Jeol, JSM 590 0LV, Tokyo, Japan) fonctionnant à une tension d'accélération de 15 kilovolts, d'une distance de 8-37 mm et d'un rapport optique de 1000-2000 -5000- 10000 X à fin d'obtenir une représentation significative de la microstructure de la peau de chèvre

RESULTATS
ET
DISCUSSION

I. Caractéristiques de la fabrication du fromage *Bouhezza* selon l'enquête

Le présent chapitre regroupe toutes les informations relatives à la caractérisation du fromage *Bouhezza* selon les résultats d'une enquête réalisée dans la zone des *Chaouia*. Ses principaux objectifs sont la délimitation géographique de la zone de fabrication du fromage et la collecte d'un maximum d'informations sur cette pratique traditionnelle avec un échantillon de familles plus important par rapport aux travaux antérieurs (ZAIDI *et al.* 2000 ; AISSAOUI ZITOUN, 2004). Les questions portent sur la préparation de la *Chekoua* du *Bouhezza*, le processus de fabrication, et les modes de consommation et de conservation.

I.1. Description du déroulement de l'enquête

L'enquête a été menée dans différentes communes de la zone des *Chaouia*, à différentes périodes de l'année et selon les disponibilités des familles. Elle a été réalisée par interview. Différents problèmes ont été soulevés dès le lancement de cette enquête et nous avons jugé utile de les signaler avant de procéder à l'exploitation de ses résultats.

I.1.1. Difficultés d'accès à l'information

L'information, tirée directement des déclarations des familles exige notre déplacement dans différentes communes et douars où nous avons soulevé plusieurs difficultés pratiques, liées à la géographie de la zone des *Chaouia* et aux coutumes et us de ces familles. Les plus marquantes sont :

- Difficultés d'accès aux familles surtout celles situées en zones rurales et parfois même en zones urbaines.
- Difficultés de communication avec les femmes et aussi avec le langage *Chaoui*, fréquemment utilisé et principalement avec les personnes âgées ;
- Souvent, il est important d'avoir une personne proche pour établir le lien avec la famille enquêtée;
- Difficultés de précision des volumes et des quantités utilisés pour les préparations. L'appréciation se fait par souvent à vue d'œil.

I.1.2. Collecte des échantillons de *Bouhezza* de ferme

La collecte d'échantillons de fromage de ferme est primordiale pour une meilleure caractérisation expérimentale. Cependant, l'obtention et la collecte des échantillons est

elle-même sujette à quelques difficultés. En plus du problème d'accès aux fermes, la fabrication du fromage *Bouhezza* se fait par l'ensemble des familles une fois par an, et pas forcément tous les ans. Ceci est un réel problème où la répétabilité ne peut se faire durant la même saison. Une ferme ne peut donner qu'un échantillon par an (saison printemps/été). D'autre part, la durée d'affinage du fromage est différente d'une famille à une autre ce qui rend la comparaison difficile. S'ajoute à ceci, les us de plusieurs familles qui n'acceptent pas de vendre le fromage et ne peuvent nous procurer qu'une petite quantité assurant un minimum d'analyses.

I.2. Délimitation de la zone géographique de la fabrication du fromage *Bouhezza*

L'enquête a pu toucher un échantillon global de 841 familles se répartissant dans la zone des *Chaouias* et dans sa périphérie. Parmi ses enquêtées, 289 familles connaissent et fabriquent le fromage *Bouhezza* soit 34 % des familles (Fig. 18).

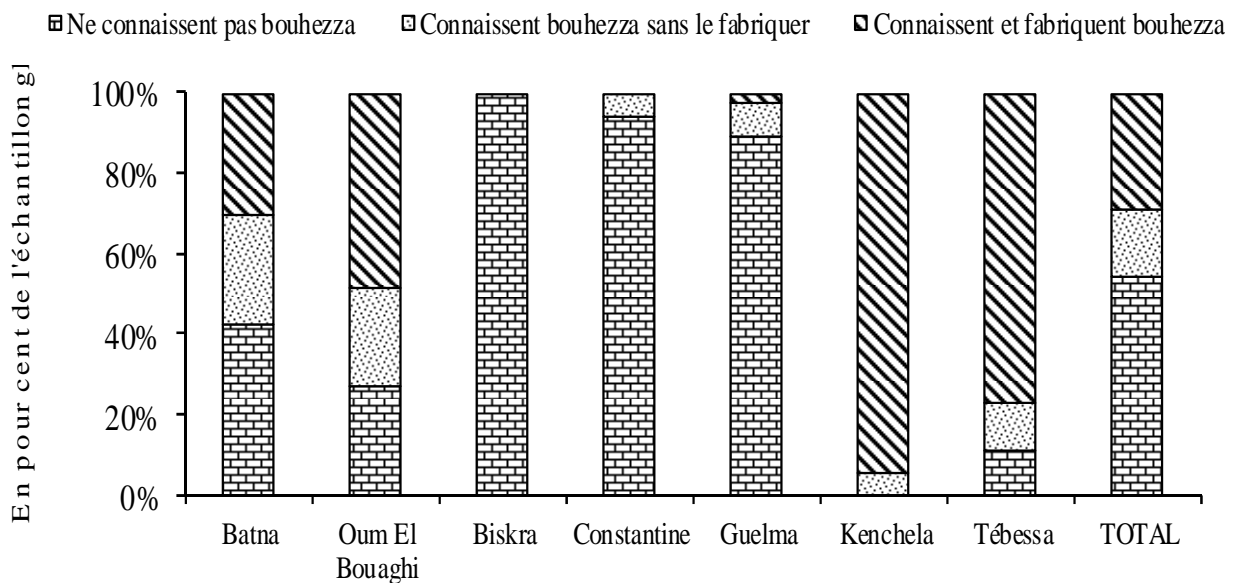


Figure 18 : Répartition des enquêtés par wilaya selon la connaissance ou non de la pratique de *Bouhezza*

La fabrication de *Bouhezza* se concentre dans la région des *Chaouias*. Elle se propage dans plusieurs wilayas de l'Est de l'Algérie. Sur la base de ces informations, la fabrication de *Bouhezza* a été confirmée dans plusieurs communes des wilayas d'Oum El Bouaghi, Batna, Khenchela, et Tébessa comme illustré en Tableau 9.

Tableau 9: Pratique de *Bouhezza* confirmée dans les wilayas et communes correspondantes

	Tébessa	Oum El Bouaghi	Batna	Khenchela
Communes	Aïn Zerga	Ain Babouche	Batna	Baghai
	Bir el-Ater	Ain Beida	Chemora	Kais
	Bir MokkaDEM	Ain Fakroun	El Madher	Khenchela
	Boulhaf Dir	Ain Kercha	Merouana	M'Toussa
	Cheria	Ain M'lila	Timgad	Remila
	El Kouif	Ain Zitoun		
	El Meridj	Berriche		
	El Ogla	Dhala		
	Essatha	Ksar Sbahi		
	Guorriguer	Oum El Bouaghi		
	Hammamet	Sigus		
	Mardja			
	Morsott			
	Ogla Melha			
	Ouenza			
	Tébessa			
		16/28 communes	11/29 communes	5/61 communes

La figure 19 montre que la majorité des enquêtées habitent dans les deux wilayas d'Oum El Bouaghi et de Batna. C'est dans la commune d'Ain Fakroun où la pratique de *Bouhezza* semble être la plus répandue. D'autre part nous avons noté une bonne répartition de la pratique dans les communes de la wilaya de Khenchela quoique le nombre de familles qui préservant cette tradition est minime. Par ailleurs, la plupart des enquêtés vivent en zones semi-urbaines avec un total de 76,82 % des familles.

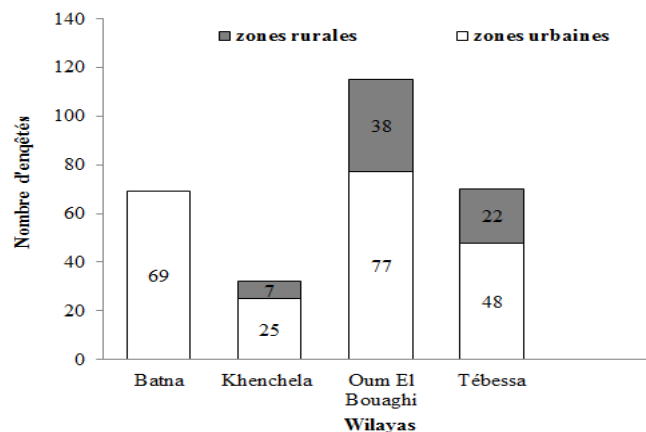


Figure 19 : Répartition des enquêtés par zones urbaines et rurales

En complément avec les informations données par AISSAOUI ZITOUN (2004), le tracé de la zone géographique de la fabrication de *Bouhezza* s'étend principalement du côté de Tébessa et de Khenchela. Le terroir du fromage *Bouhezza* continu jusqu'aux limites des frontières tunisiennes comme illustré en Figure 20.



Figure 20 : Délimitation géographique de la zone de fabrication du *Bouhezza*

Batna (1), Oum El Bouaghi (2), Khenchela (3) et (4) Tébessa

I.3. Origines des familles et étymologie de « *Bouhezza* »

Dans les wilayas de Batna, Khenchela et Oum El Bouaghi l'origine ethnique de l'ensemble des familles est *Chaoui*. Cependant, dans les communes de Tébessa les enquêtés sont des *Chaouis* et des T'bessi *N'mamcha*. La pratique de *Bouhezza* s'étale dans la région de l'Aurès, de Batna jusqu'aux frontières tunisiennes à Tébessa. A cette dernière limite, quelques familles connaissent le fromage fabriqué dans la peau de chèvre sous le nom de *Malh Dh'ouab* ou *Bou mellal*.

L'histoire du fromage *Bouhezza* semble être disparaître avec la volatilisation des anciennes traditions. D'un point de vue dénomination, nous avons relevé avec quelques enquêtés d'Oum El Boughi, Khenchela, Tébessa et Batna que le fromage est connu sous deux autres dénominations soit « *Melh dhouab* et *Boumelel* ». La dénomination « *Bouhezza* » reste la plus commune dans cette zone. Etymologiquement, c'est un mot d'origine arabe " هزة بو " qui peut être subdivisé en deux mots soit « *bou* » qui signifie

celui ou celle et, « *hezza* » qui se rapporte au verbe soulever. Cette dénomination se réfère peut être au fait que la peau de chèvre est suspendue durant toute la période de fabrication.

I.4. Rôle de la femme dans la fabrication de *Bouhezza*

La fabrication de *Bouhezza* est une activité exclusivement reversée à la femme, dont l'âge est entre 30 et 100 ans. Peut-être, parce que la préparation des repas est une des responsabilités de la femme. Aussi, vu l'importance attribuée à la réussite de la fabrication, c'est la grand-mère ou la mère qui s'en occupe.

Pour toutes ces femmes, l'art de fabriquer *Bouhezza* a été formé par leurs mères, grand-mères ou belles-mères. Elles ont gardé presque les mêmes habitudes alimentaires et traditions. Le procédé de fabrication de *Bouhezza* est considéré comme un héritage précieux. La femme s'occupe de la préparation du *Lben* et de son utilisation pour la fabrication de fromages. Aussi, c'est elle qui s'occupe du traitement et de la préparation de la « *Chekoua* » ou appelé aussi selon 20 % des enquêtées d'Oum El Bouaghi par « *Djeld* ». En parallèle à ses activités ménagères, la femme retrouve une petite part dans le cheptel et le poulailler de sa famille.

Nous signalons que cette fabrication est restée depuis longtemps destinée à l'autoconsommation. Il y a seulement quelques années où elle a commencé à se propager dans certaines localités et vendue dans des petits commerces mais c'est toujours la femme qui s'en occupe chez-elle.

I.5. Préparation du contenant de la masse fromagère l'outre « *Chekoua* » ou « *Djeld* »

L'utilisation de la peau d'animaux dans la fabrication du fromage *Bouhezza* est assez importante et spécifique. Elle permet de transformer le liquide du *Lben* en fromage. Elle joue à la fois le rôle de séparateur de phase (caillé-lactosérum) et le rôle de contenant pour l'affinage et la conservation du fromage. Cette fabrication nécessite une préparation particulière du contenant de la masse fromagère, une outre communément appelée « *Chekoua* » ou « *Djeld* ». Dans cette partie nous donnerons les méthodes traditionnelles et les étapes de la préparation selon l'enquête et un chapitre complémentaire (cf. IV. *Chekoua* du fromage *Bouhezza*) portera sur les caractéristiques microbiologique et autres de cette *Chekoua*.

I.5.1. Types des peaux employées

La confection du contenant est faite avec la peau d'animaux non fendu, de chèvre ou de brebis. La peau de brebis est la plus utilisée à Batna et à Khenchela alors que la peau de chèvre est surtout utilisée par les enquêtés d'Oum El Bouaghi et de Tébessa. Selon les réponses, la peau de chèvre est plus solide et donc plus facile à l'utilisation. La peau de brebis est plus fine avec une couleur plus claire. Par ailleurs, et selon les familles, l'utilisation des deux types de peaux, de chèvre ou de brebis, est possible et elle dépend de la constitution du cheptel de la famille (Fig. 21).

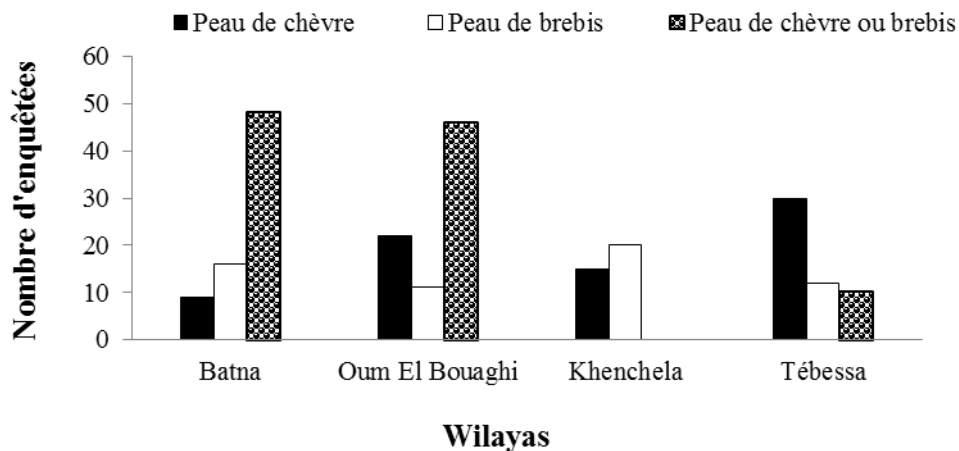


Figure 21 : Répartition des enquêtés selon le type de peau utilisé en fabrication

Le volume total du contenant « *chekoua* » varie d'une famille à une autre et dépend du type et de la taille de l'animal. En général la peau de brebis (5 à 20 L) est plus grande que celle de chèvre (5 à 15 L), et par conséquent la taille de la *chekoua*. L'appréciation de la taille de la *chekoua* de *Bouhezza* est donnée par 67,83% de nos enquêtées, le reste n'ont pas répondues (Fig. 22). Parmi ceux qui ont répondu, 45,36% ont déclaré l'utilisation d'une peau de plus de 20 L, suivie par ceux utilisant une peau de 11 à 20 L (35,57% des réponses, principalement d'Oum El Bouaghi) et en dernier par les ménages employant les petites peaux de 5 à 10 L (19,07 %, principalement de Tébessa).

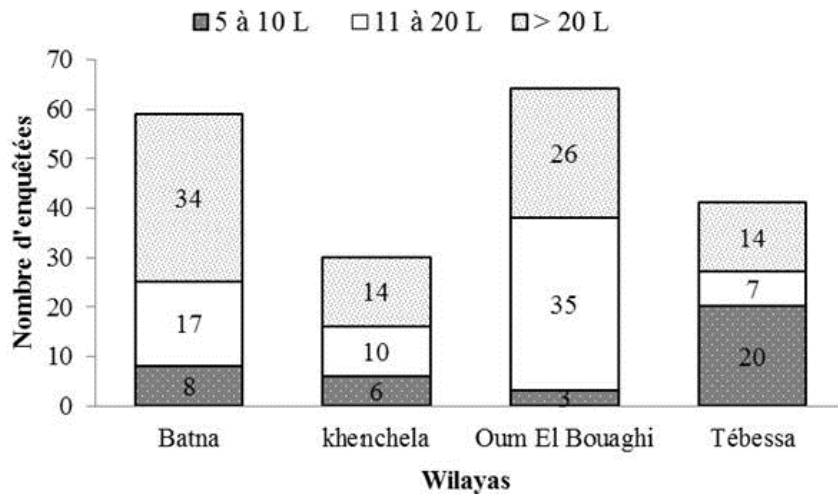


Figure 22 : Partage des enquêtés selon la taille de *Chekoua* utilisée

I.5.2. Traitement et confection de la peau

Les étapes de la préparation de la *chekoua* sont le dépilage par putréfaction, le traitement avec spécialement le sel et le genièvre, le lavage, le ficelage et la nouaison. Le diagramme donné en figure 23 illustre l'ensemble des informations collectées sur cette tradition selon nos enquêtés en complément avec ceux des résultats ultérieures (AISSAOUI ZITOUN, 2004).

La peau est traitée avant qu'on lui donne la forme d'un contenant dont la seule ouverture reste est celle du cou. Le traitement de la peau récupérée non fendue juste après abatage commence par le dépilage. Pour ce faire, toutes les enquêtés font recours à la putréfaction dans un sac en plastique. Selon la température de la saison, la putréfaction naturelle de la peau dure entre 2 à 7 jours. La peau peut être trempée avec l'eau tiède avant abondant. Les principales remarques que nous avons noté dans ce traitement sont :

- Le dépilage se fait par arrachage manuel et compléter par rasage pour les petites parties difficiles (extrémité des membres supérieures ou du cou).
- Toutes les familles utilisent le sel et le genièvre pour le traitement de la peau après dépilage et lavage. Ces produits sont utilisés soit après macération ou directement par saupoudrage du mélange ;
- Le sel est l'ingrédient de base utilisé par toutes les familles. Elles déclarent que le sel absorbe l'eau et le sang retenu dans la peau et donne une solidité à cette dernière ;

- Les autres produits auxiliaires du traitement sont le tanin (poudre ou cendres), la semoule et l'orge. Mais, leur utilisation se fait en petite quantité, une à deux cuillère à soupe selon 15 % des réponses ;
- Nous notons qu'après les ingrédients de base, le tanin est le plus utilisé. Il contient des composés imputrescibles d'où son utilisation dans le traitement des cuirs. Dans la fabrication de *Bouhezza* les familles déclarent que le tanin aide à renforcer la solidité de la *chekoua* et la semoule à éclaircir sa couleur.

I.5.2.1. Traitement avec le sel et le genièvre

a) Intérêt du genièvre : La plante de genièvre répand une agréable odeur balsamique et l'huile essentielle du fruit à une odeur assez camphrée (RICHARD et LOO, 1992 ; RICHARD *et al.*, 1992).

b) Mode d'application du genièvre : Dans la tradition de *Bouhezza* les parties du genièvre sont utilisés sous forme solide ou liquide et transmettent par diffusion leurs aromates pour chasser les odeurs putrides. La forme solide du genièvre se fait après un pilage du fruit et des écorces et mélange avec du sel. La peau lavée est saupoudrée des deux côtés de ce mélange puis pliée et laissée à l'ombre dans un tissu. Cependant, la forme liquide se pratique après macération du genièvre dans l'eau bouillante. La solution est refroidie puis salée. La peau est laissée macérer dans cette solution durant quelques jours avec retournement. Cette macération peut être aussi réalisée dans du *Lben* ; c'est cette pratique qui a été citée par ZAIDI *et al.* (2000) et aussi par 11,3 % de nos enquêtés.

Une combinaison des deux méthodes est effectuée par quelques familles. La peau est saupoudrée d'abord avec du sel et de genièvre puis elle est laissée reposer quelques jours (2 à 4 jours). Ensuite, elle est trempée dans l'eau de macération du genièvre, tanin et sel au moins une journée.

c) Quantité de genièvre et de sel : Les quantités de sel et de genièvre utilisées sont variables d'une famille à une autre. Les enquêtées donnent « la poignée » comme unité de mesure ou bien à vue d'œil, elles estiment la quantité qui suffirait pour couvrir les deux faces de la peau, ce qui semble atteindre 2 Kg de mélange genièvre-sel selon la taille selon la taille de la peau.

d) Durée du traitement : La durée du traitement qui va de 1-2 jours à 21 jours dans le mélange genièvre-sel est aussi un facteur variable. Selon certaines précisions des femmes,

plus la durée du traitement de la peau est longue, meilleure sera sa qualité du point de vue solidité et odeur. La durée la plus prépondérante est celle de 7 à 15j avec une fréquence de 60% des réponses.

I.5.2.2. Nouaison de la peau

Après l'étape du traitement, la peau sera nouée et ficelée de manière à lui donner la forme d'un contenant. D'abord, la peau est retournée côté poils à l'intérieur et côté chair à l'extérieur. Ensuite, toute la partie postérieure est coupée et éliminée jusqu'au niveau des pâtes. Cette grande ouverture est cousue en utilisant un fil solide et un os ou un bâtonnet en bois qui servira à la fixation. La nouaison des pâtes antérieures est réalisée avant retournement à l'aide d'un morceau de bois (tanin, liège, ou un noyau de datte) et du fil solide. La fabrication du fromage *Bouhezza* sera menée et contrôlée à travers une seule ouverture, celle du cou. Une fois cette opération achevée, la *chekoua* est bien rincée à l'eau. Ensuite et pour perdre cette eau de lavage, la *chekoua* est gonflée d'air puis suspendue après nouaison du cou.

Par ailleurs, nous avons soulevé que 75 % des enquêtés procèdent à l'élimination des restes des débris de genièvre ou autres par rinçage de l'intérieure de la *Chekoua* à l'aide de *Lben* (1 à 2 L). L'ouverture du cou est nouée, puis la peau est aplatis pour que le *Lben* soit en contact avec toutes ses parties. La *chekoua* est laissée reposer quelques heures (63 % d'entre eux) à une nuit (37 % d'entre eux). Après ce temps le *Lben* et la *Chekoua* est rincée à nouveau à l'eau, puis gonflée et suspendue et utilisation directement dans la fabrication du *Bouhezza*. C'est cette pratique qui a été étudiée pour vérifier le rôle microbiologique de la *Chekoua* et du *Lben* de rinçage sur sa qualité microbiologique (cf. partie matériel et méthodes, II.8. Caractérisation de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza*).

I.5.2.3. Conservation de la *Chekoua*

En dernier, nous signalons que, la peau peut être séchée et conservée, avant ou après confection. Chez toutes les familles (100 % des enquêtées), les seuls agents de conservation sont le sel et le genièvre. Après déshydratation complète, la *chekoua* peut être conservée quelques mois à plus d'une année. Sa réutilisation nécessite un simple trempage dans l'eau avec plusieurs retournements jusqu'à ramollissement de la peau (une nuit ou plus).

I.5.2.4. Diagramme synthétique de la préparation de la *Chekoua*

En tenant compte des conclusions de chaque opération de préparation de la *chekoua*, nous décrivons dans la figure 23 le schéma le plus prépondérant du traitement et de la confection de la *chekoua* de *Bouhezza*.

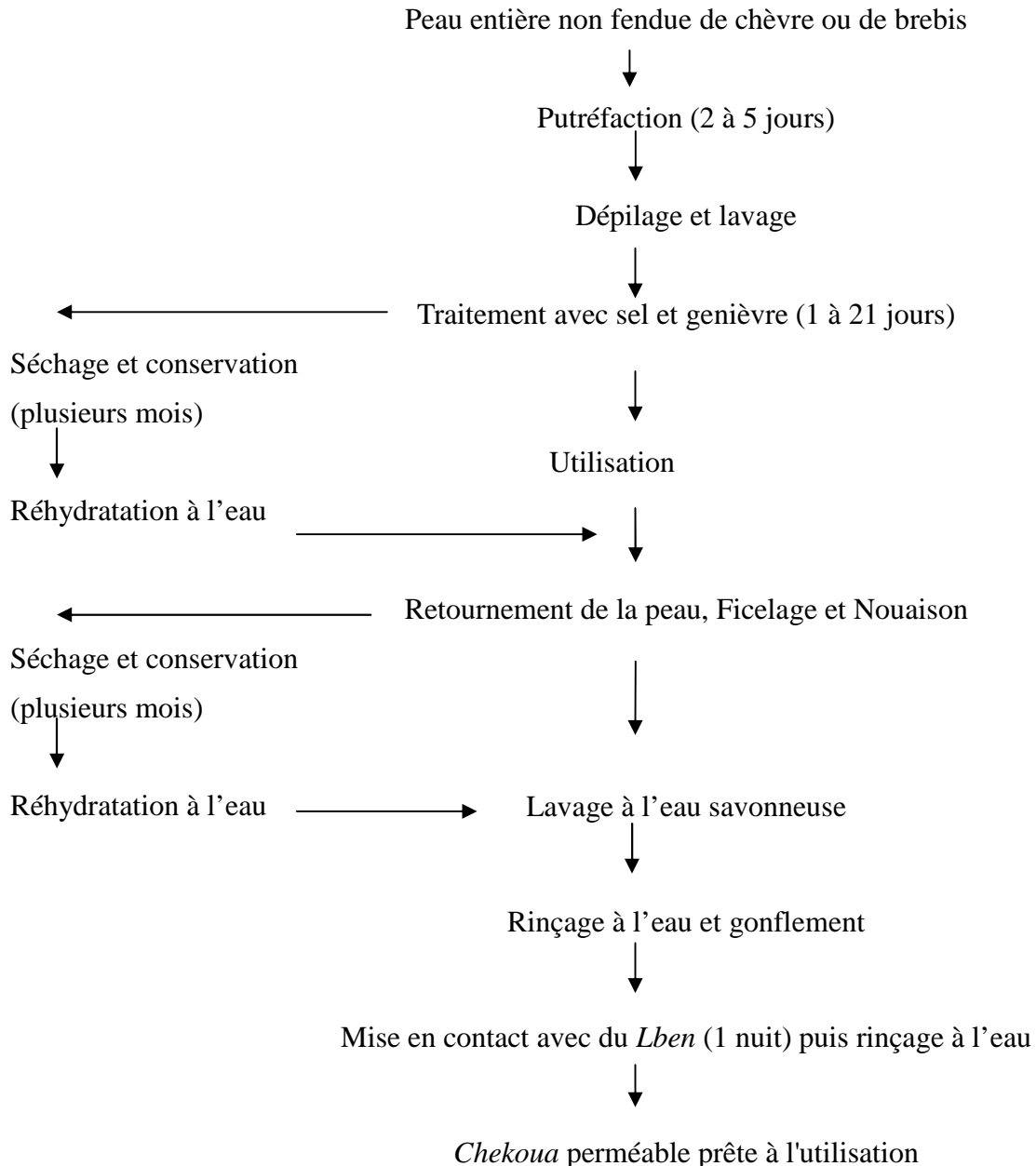


Figure 23 : Diagramme traditionnel du traitement et de la préparation de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza*

Aussi, il faut noter que durant la fabrication du *Bouhezza*, la *Chekoua* doit être suspendue dans un endroit aéré et à l'ombre et bien entretenue par des lavages réguliers à l'aide de l'eau et de raclages légers de sa surface externe pour éviter sa perforation.

Les différentes pratiques décrites par la femme *Chaouia* pour la préparation de la *chekoua* de *Bouhezza* montrent comment à partir d'une peau poilue et putride confectionner un contenant inodore et perméable utilisable pour la fabrication d'un fromage. Ces étapes semblent ordinaires pour la plupart de nos enquêtées. Au fond, elles sont d'une grande importance et elles font partie de l'héritage culturel de notre pays.

I.6. Conditions de l'obtention de la pâte fromagère de *Bouhezza*

Après cette confection de la *Chekoua*, la fabrication du fromage commence. Dans ce qui suit nous donnerons les conditions de la fabrication du fromage *Bouhezza* (période de fabrication, caractéristique du *Lben*, salage, assaisonnement de la pâte, conservation et défauts de fabrication) selon les résultats de l'enquête.

I.6.1. Période et durée de la fabrication de *Bouhezza*

La fabrication du fromage *Bouhezza* s'étale sur plusieurs mois dès le début du printemps. Le lancement de cette fabrication est entre les mois de mars et juin, selon 84,3% des enquêtées avec une fréquence de 63 % pour le mois de Mars (Tab.10).

Tableau 10 : Mois du lancement de la fabrication du fromage *Bouhezza*

Wilayas	Mois du lancement de la fabrication							
	Mars		Avril		Mai		Juin	
	ZU	ZR	ZU	ZR	ZU	ZR	ZU	ZR
Batna	58		2		3		4	
Khenchela	9		6		7	2	2	4
Oum El Bouaghi	35	27	10	7	6	10	3	
Tébessa	11	12	5	1	7	5	3	2
Total réponses (241/286 enquêtées)	113	39	23	8	23	17	12	6

ZU : zone urbaine, ZR : zone rurale

Selon les déclarations des familles (180/286 familles), la consommation du fromage *Bouhezza* est possible à partir d'un mois de fabrication (62,93 % des familles). Cependant la durée totale de la fabrication, c'est-à-dire jusqu'à vidange de la *chekoua*, elle est d'un à

six mois (Fig. 24). La durée de trois mois est la plus donnée par nos enquêtées (45 % des réponses), principalement par ceux de Khenchela et d'Oum El Bouaghi. Par ailleurs, 28,33% des réponses peuvent étalés la fabrication du fromage jusqu'à 6 mois.

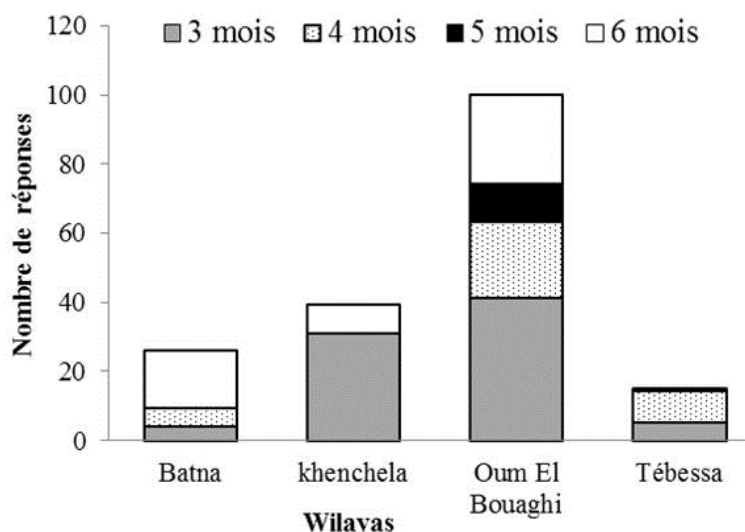


Figure 24 : Durée totale de la fabrication-affinage de *Bouhezza*

I.6.2. Matières premières utilisables dans la fabrication de *Bouhezza*

I.6.2.1 Types des laits de fabrication

Les laits des différentes races peuvent être utilisés, seul ou en mélange avec une proportion respective de 59 et de 41% des réponses (soit 247 réponses/286 enquêtées). Dans l'ensemble des résultats, le lait de vache est le plus utilisé, suivie par le lait de chèvre et en dernier le lait de brebis (Fig. 25).

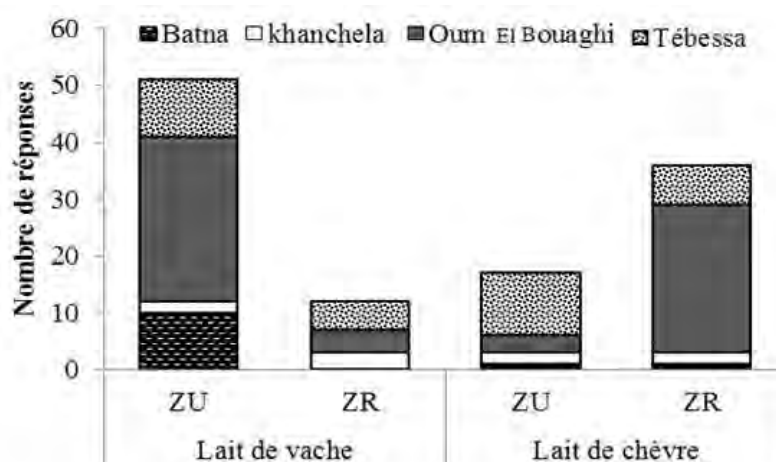


Figure 25 : Répartition de l'utilisation du lait de vache et de chèvre par les enquêtés des différentes wilayas (ZU et ZR : zones urbaines et rurales)

En se rapportant aux déclarations des familles, le lait de vache est de plus en plus utilisé vue sa disponibilité. A Oum El Bouaghi, le lait de vache est surtout utilisé en zones urbaines/semi urbaines alors que le lait de chèvre est préféré en zones rurales. Par contre à Tébessa, c'est le lait de chèvre qui est le plus utilisé en zones urbaines. L'utilisation du lait de brebis est la plus fréquente à Tébessa puis à Oum El Bouaghi. Les familles de Tébessa justifient leur choix par un élevage de brebis plus important que les autres races. Toutes les informations sur le type de lait utilisé, par les enquêtées des différentes wilayas, montrent qu'il dépend du type d'élevage des familles.

I.6.2.2. Place du *Lben* dans la fabrication

Le *Lben* occupe une place très importante dans la fabrication du *Bouhezza*, en effet 95,8 % des familles enquêtées l'utilise pour lancer la fabrication du fromage. Le *Lben* est de préférence écrémé et peu acide. La quantité du *Lben* de départ n'est pas précisée par les familles qui remplissent tout le volume de la *chekoua* ou sa moitié. L'ajustement des ajouts successifs du *Lben* se fait en fonction de la disponibilité du lait/*Lben* et de la vitesse d'égouttage. Le reste des familles, dont l'origine est d'Oum El Bouaghi, débute la fabrication avec le lait fermenté « *Rayeb* » à la place du *Lben* pour obtenir un fromage de faible acidité.

I.6.2.3. Place du lait cru dans la fabrication

Le lait cru est utilisé en fin de fabrication du fromage dans le but de finaliser l'affinage du fromage. Il permet selon les enquêtés de corriger l'acidité et le goût salé prononcés du fromage. L'ajout du lait cru se fait une ou plusieurs fois juste avant consommation du fromage.

I.6.2.4. Salage durant la fabrication

Dans la fabrication du fromage *Bouhezza* le salage peut se réaliser en masse, directement dans le *Lben* ou dans le fromage. Le sel est le seul agent de contrôle de la fabrication. La quantité ajoutée à la matière première est très variable d'une famille à une autre [de 20 à 125 g/L]. Le sel joue un rôle essentiel pour améliorer les propriétés organoleptiques et la durée de conservation du fromage. La quantité de sel retenue pour le diagramme adopté est celle d'une cuillère à soupe par litre de *Lben* selon 57 % des réponses retenues ce qui correspond à 20-25 g/L. Chez toutes les familles le goût salé, et même acide, du fromage est corrigé à la fin de la fabrication après dégustation par ajout (s) de lait cru.

I.6.2.5. Assaisonnement de *Bouhezza* avec le piment rouge piquant

Bouhezza est consommé pimenté ou non avec le piment rouge piquant sous forme de poudre ou en pâte « *H'rissa* » et le plus souvent en hiver. Sous forme de pâte ou poudre déshydraté, il assaisonne plusieurs plats traditionnels (*aiche*, *couscous* et *m'kartfa*). Aussi, il peut être aussi consommé en tartine.

I.7. Défauts de fabrication et mode de conservation de *Bouhezza*

Les défauts de fabrications de *Bouhezza* signalés par nos enquêtés nous renseignent en partie sur les caractéristiques sensorielles recherchées dans le fromage. Ces principaux défauts sont le développement du rancissement et l'apparition de couleurs (taches rouge orange, bleu ou jaune) qui ont été signalés par l'ensemble des enquêtés. D'autres caractères indésirables dans le fromage peuvent apparaître comme l'odeur de putréfaction, de levure ou de rance.

Concernant le mode de conservation du fromage après fabrication, l'outre reste un des moyens qui permet une conservation hors réfrigération durant une période plus au moins longue (quelques semaines). D'autres ustensiles (bocaux en poterie/verre ou récipients alimentaires) sont utilisés avec réfrigération.

Conclusion partielle

Un groupe important d'informations a été collecté lors de notre rapprochement des familles. L'enquête a pu toucher un échantillon global de 841 familles se répartissant dans la zone Est de l'Algérie. Parmi ses enquêtées, 289 familles connaissent et fabriquent le fromage *Bouhezza* soit 34 % des familles. Les résultats de la répartition des ses enquêtés montrent que la pratique du fromage *Bouhezza* découle de la région des *Chaouia*, qui s'étale sur plusieurs wilayas du pays. Sur la base de ces informations, la fabrication de *Bouhezza* a été confirmée dans les wilayas d'Oum El Bouaghi (11/29 communes), de Batna (5/61 communes), de Khenchela (5/21 communes), et de Tébessa (16/28 communes). La zone géographique de la pratique du fromage *Bouhezza* s'étale dans la zone des *Chaouia* jusqu'aux limites des frontières tunisiennes.

D'autre part, nous avons confirmé le diagramme de fabrication le plus prépondérant entre les réponses des enquêtés. La fabrication du fromage commence à la fin du mois de mars correspondant à la saison des disponibilités fourragères. Elle est menée pendant plusieurs semaines à quelques mois. Selon les déclarations d'environ 63% des familles la

consommation du *Bouhezza* est possible à partir d'un mois de fabrication (35% des familles). Cependant la durée totale de fabrication, c'est-à-dire jusqu'à vidange de la *Chekoua*, est de un à six mois. Chez toutes les familles enquêtées qui connaissent et fabriquent *Bouhezza*, cette fabrication nécessite une préparation particulière du contenant de la masse fromagère «*Chekoua* » ou appelé aussi par 20 % des enquêtées d'Oum El Bouaghi par «*Djeld*». La fabrication se poursuit par la préparation du *Lben* et puis par l'élaboration du fromage. La *Chekoua* est un sac préparé à partir de la peau de chèvre ou de brebis non fendue, traitée principalement avec du sel et du genièvre. Elle joue le rôle à la fois d'un contenant de la masse fromagère et d'un séparateur de phase (ultrafiltre).

Bouhezza peut être fabriqué avec le lait de différentes espèces (chèvre, brebis ou vache), seul ou en mélange. Dans l'ensemble des résultats, le lait de vache est le plus utilisé, suivie par le lait de chèvre et en dernier le lait de brebis. Toutes les informations sur le type de lait utilisé, par les enquêtées des différentes wilayas, montrent qu'il dépend du type d'élevage des familles. La fabrication de *Bouhezza* est lancée le plus souvent avec le *Lben* et le sel (95,8 % des familles), et terminé avec l'ajout du lait cru. Les enquêtés décrivent cette étape «finaliser la maturation du fromage» ce qui permet de corriger l'acidité et le taux de sel du fromage. Le salage est réalisé en masse nous avons retenue 20 à 25 g de sel/L de *Lben* ajouté. *Bouhezza* est épicé pour la consommation avec le piment rouge piquant. Le fromage est consommé directement ou conservé soit sous forme de pâte humide ou de poudre déshydratée après séchage au soleil. La durée de conservation est de deux semaines à plusieurs mois. Le fromage ainsi préparé assaisonnera les sauces des plats traditionnel (*M'kartfa*, *coucous*, et *aiche*).

Dans notre cas, la caractérisation par l'enquête reste primordiale mais toujours descriptive et une partie des informations recueillies nécessite d'être précisée. Le complément de caractérisation du *Bouhezza*, se fera donc sur des échantillons de fermes collectés de quelques familles enquêtées et aussi sur des échantillons de fabrications expérimentales. Cette caractérisation expérimentale comprendra la composition microbiologique et physico-chimique, la description de son profil sensoriel et aromatique, les propriétés rhéologiques et texturales de la pâte des caractéristiques de la *Chekoua*, seront prospectés par une approche expérimentale dans les chapitres qui suivent.

II. Caractéristiques du fromage *Bouhezza* selon l'expérimentation

La caractérisation expérimentale a porté sur des échantillons de *Bouhezza* de ferme et de fabrications contrôlées. Elle concerne différents aspects du fromage. Nous avons jugé important de commencer par les résultats des caractéristiques microbiologiques du fromage puisque ce sont ces microorganismes qui sont les principaux agents d'affinage et interviennent directement dans toutes les modifications du fromage (composition, arômes et texture).

II.1. Ecosystème microbien du fromage *Bouhezza*

Nous aborderons dans cette partie les résultats de la caractérisation microbiologique globale d'un échantillon de 16 fromages de ferme à différents stades d'affinage [30j (n=3), 45j (n=5), 60j (n=6), 75j (n=1) et 150j (n=1)] et de 06 fabrications de *Bouhezza* affinées jusqu'à 70j. L'identification des bactéries lactiques a été réalisée sur deux des fabrications contrôlées simultanément.

II.1.1. Composition et évolution des groupes bactériens dans *Bouhezza*

II.1.1.1. Flore totale, flore lactique et levures et moisissures

L'importance relative des principaux groupes bactériens présents dans le *Bouhezza* de fermes et d'expérimentations est représentée dans la figure 26.

Bouhezza est un fromage typiquement fabriqué à partir de lait cru nonensemencé. Il assure cependant le développement d'une microflore très diversifiée et en bon nombre. Ceci se confirme par sa charge importante en flore mésophile totale qui a varié en moyenne entre 8,45 et 4,72 log ufc/g. La charge la plus faible est celle de *Bouhezza* le plus affiné (150 j). Ce phénomène a été déjà signalé dans le fromage au lait cru São Jorge (KONGO *et al.*, 2009) où le nombre de microorganismes diminue avec la durée d'affinage, de 0j à 150j. Concernant les résultats des fabrications contrôlées de *Bouhezza* entre 28 et 70 j, il ressort aussi que la population microbienne totale est de l'ordre de 8 log ufc/g. Cette charge s'explique par l'utilisation du lait cru et l'enrichissement continu de la *Chekoua* par de nouvelles bactéries contenues dans le *Lben*.

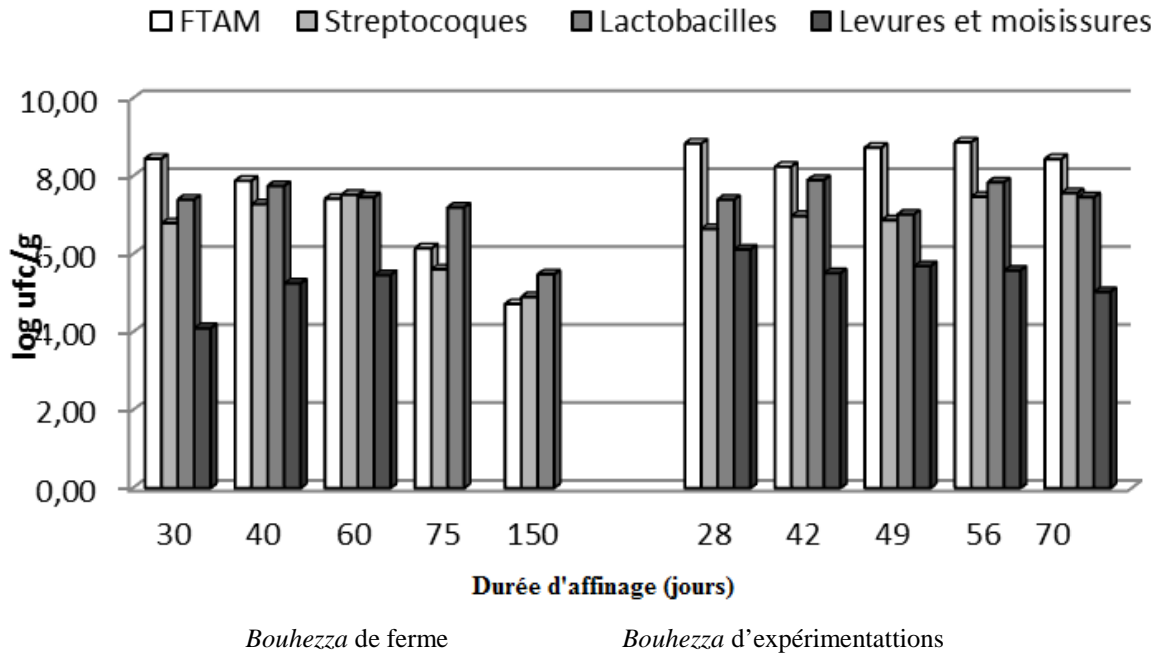


Figure 26 : Importance relative des groupes bactériens présents par rapport aux durées d'affinage du *Bouhezza* de ferme et d'expérimentations (n=6)

La microflore du fromage de ferme est formée essentiellement de bactéries lactiques : les streptocoques lactiques mésophiles (4,9 et 7,52 log ufc/g) et les lactobacilles mésophiles (5,48 et 7,75 log ufc/g). De même, dans les fromages d'expérimentations la présence de ces groupes bactériens est marquée par une charge variant entre 6 et 7 log ufc/g. D'après les résultats de SAOUDI (2012), ces bactéries constituent la principale flore du fromage *Bouhezza* de fermes. En effet, les bactéries lactiques constituent la principale flore dans d'autres fromages artisanaux (CUESTA *et al.*, 1996 ; MUCCHETTI *et al.*, 2009). Selon CASEY *et al.* (2006), les lactobacilles mésophiles sont présents dans les fromages avec une charge de 6 à 8 log ufc/g. Aussi, selon SERHAN *et al.* (2009), dans le fromage en peau de chèvre *Darfiyeh*, la charge des lactobacilles et streptocoques lactiques est de l'ordre de 7 log ufc/g.

Les levures et moisissures sont présentes avec une charge plus faible (4 à 5 log ufc/g dans le *Bouhezza* de fermes et 5 à 6 log ufc/g dans le *Bouhezza* d'expérimentations). Au regard des phénomènes de maturation et surtout de dégradation de matières azotées, l'ensemble de ces groupes jouent un rôle majeur. Selon AISSAOUI ZITOUN (2004), ces différentes flores sont dotées d'activités protéolytique et lipolytique. Les bactéries lactiques indigènes (NSLAB) sont dotées de systèmes enzymatiques importants, principalement protéolytiques, activant dans la glycolyse et la protéolyse des fromages

(WOUTRES *et al.*, 2002). Elles produisent des peptides courts et des acides aminés qui entre dans la composition des saveurs (SINGH *et al.*, 2003).

D'autre part, et vu l'allure de l'évolution des différents groupes de microorganismes, entre 0 et 70j, le phénomène de succession entre les flores nous semble minime voire inexistant puisque la charge des bactéries lactiques et des levures-moisissures fluctue peu et aucune flore n'a disparue au cours de la fabrication. Selon AISSAOUI ZITOUN (2004) la flore halotolérante est restée presque stable durant les 70j d'affinage de Bouhezza (à 4 log ufc/g). Les bactéries lactiques sont cependant la flore la plus importante et il serait intéressant d'approcher leur identification.

II.1.1.2. Flore de contamination et flore pathogène

Dans l'ensemble des échantillons de *Bouhezza* de ferme et de fabrications contrôlées, l'absence de bactéries pathogènes a été confirmée par le système BAX® de détection génétique pour l'ensemble des bactéries : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, and *E. coli* O157H7. Les risques de contamination sont notés par la présence des coliformes totaux et fécaux. Dans les fromages de fermes, les coliformes totaux sont de l'ordre de 2 log ufc/g et dans ceux d'expérimentations ils sont entre 4 et 5 log ufc/g. Cependant, les charges des coliformes fécaux sont plus faibles, <1 log ufc/g dans les fromages de fermes et de 2 à <1 log ufc dans les fromages d'expérimentations de 28 à 70j de fabrication. Dans le fromage *Tulum*, affiné dans la peau de chèvre, le nombre des coliformes totaux est de l'ordre de 5 log ufc/g (HAYALOGLU *et al.*, 2007 b). La faible charge des coliformes fécaux et l'absence de la flore pathogène dans le *Bouhezza* affiné (de fermes ou d'expérimentations) est un résultat important dans la qualité hygiénique du fromage, vu l'utilisation du lait cru et de la peau de chèvre comme contenant, pendant plusieurs semaines. La qualité du fromage dépend principalement de la qualité du *Lben* et lait cru utilisés. Cette absence de pathogène est probablement due à l'interaction des différentes flores dans le fromage vivant en symbiose et en complémentarité entre eux et à la présence d'antibactériens (PEREZ PACHECO et BUCIO GALINDO, 2010).

II.1.2. Caractérisation des bactéries lactiques par la PCR-TTGE

Les profils de la PCR-TTGE du fromage de *Bouhezza* de ferme à différents périodes d'affinage sont comparés dans la figure 27. Nous rappelons que l'identification des différentes bactéries est basée sur des données d'espèces de références selon PARAYRE *et al.* (2007).

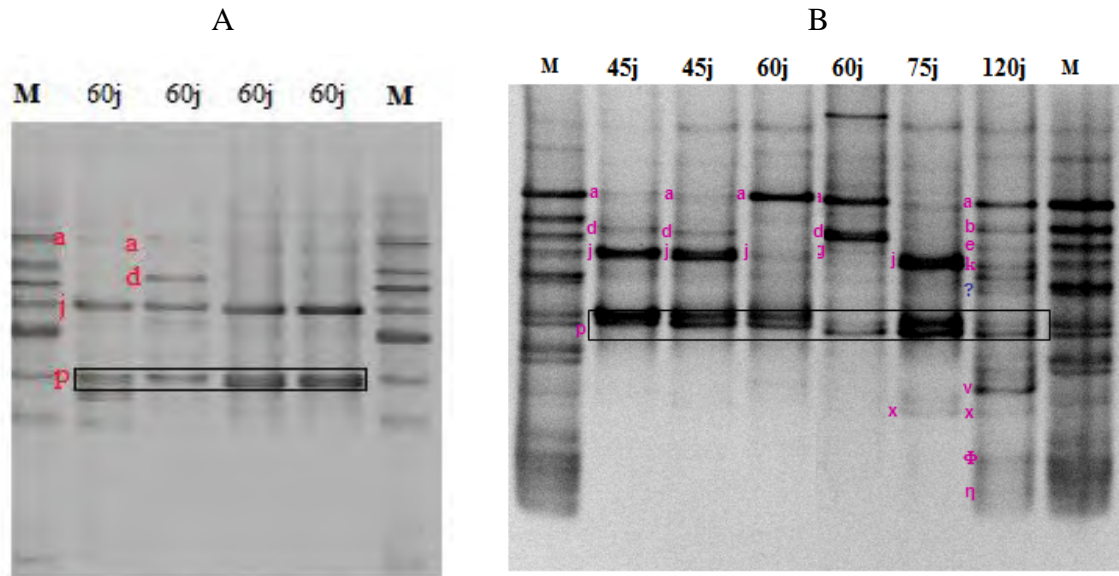


Figure 27: Profil de la PCR-TTGE du fromage *Bouhezza* de ferme

(A) Echantillons de *Bouhezza* de quatre ferme différentes, affinés à 60j ; (B) Echantillons de *Bouhezza* de six fermes différentes, affinés respectivement à 45j, 60j, 75j et 120j (SAOUDI, 2012), **M**, Marqueurs d'ADN génomique de la base de données d'espèces bactériennes de référence (colone M) (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Corynebacterium moorparkense*, *Lactobacillus paracasei*, *Arthrobacterium nicotianae*, and *Brevibacterium casei*).

L'assignation des bandes de la PCR-TTGE des échantillons du *Bouhezza* par rapport aux espèces de bases de références selon PARAYRE *et al.* (2007) est la suivante : **a**, *Lb. plantarum*/*Lb. johnsonni* ou *Lb. gasseri*; **d**, *Staphylococcus equorum* subsp. *Linens* ; **j**, *Lb. helveticus*/*Lb. acidophilus* ou *Lb. Crispatus*; **p**, *Lc. Lactis* subsp. *cremoris* ; **x**, *C. flavescens*; **Φ**, *Lb. paracasei*/*Lb. casei*/*Lb. rhamnosus*/*Lb. zae* ou *B. infantis* ; **?**, bande inconnue.

Les fromages de fermes présentent une bonne diversification en bactéries lactiques. Les profils donnés montrent la présence régulière dans tous les fromages de deux espèces *Lb. plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Fig. 27 A et B). Les travaux réalisés en collaboration avec SAOUDI (2012) (Fig. 27 B) sur des fromages de ferme montrent la présence de principalement *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* poursuivie par *Lactococcus helveticus* et/ou *Lactococcus acidophilus* /*Lactococcus crispatus*. Une autre souche rencontrée dans 04 échantillons est *Staphylococcus eqorum* subsp. *linens*. Aussi, les résultats dévoilent que le *Bouhezza* de 120 j d'affinage avait une charge microbienne faible mais variée avec détection de plus de 10 bandes dans son profil de la PCR-TTGE (Fig. 27). La présence d'une bande non identifiée est apparue dans l'ensemble des fromages de ferme.

D'autre part, et dans le cadre du projet Intégré du Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie (Italie-Algérie), entre 2009 et 2010, où nous avons été en collaboration avec le CoRFiLaC, une autre analyse d'identification a été réalisée. Les colonies de la flore lactique dénombrées sur MRS et M17 de nos échantillons de la figure 27A ont fait l'objet d'identification par la méthode moléculaire rep-PCR (Repetitive sequence base PCR) et séquençage des genes 16Sr RNA et PCR spécifique à l'espèce. D'après DEGA *et al.* (2011), cette recherche a confirmé que la microflore de *Bouhezza* est composée essentiellement de lactobacilles. Les lactobacilles identifiés sont en majorité hétérofermentaires obligée, et appartiennent tous au groupe *buchneri*. Les espèces des lactobacilles ont été très diversifiées, huit ont été identifiées qui sont *Lb. paracasei* et *Lb. kefiri*, *Lb. otakiensis*, *Lb. plantarium*, *Lb. fermentum*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. diolivorans* et *Lb. hilgardii*. Il est important de souligner que *Lb. otakiensis* a été reconnue seulement en 2009 comme nouvelle espèce du groupe *buchneri* (WATANABI *et al.*, 2009).

Les profils de la PCR-TTGE du fromage de *Bouhezza* d'expérimentations à différentes période de fabrication-affinage jusqu'à 70j sont comparés dans la figure 28.

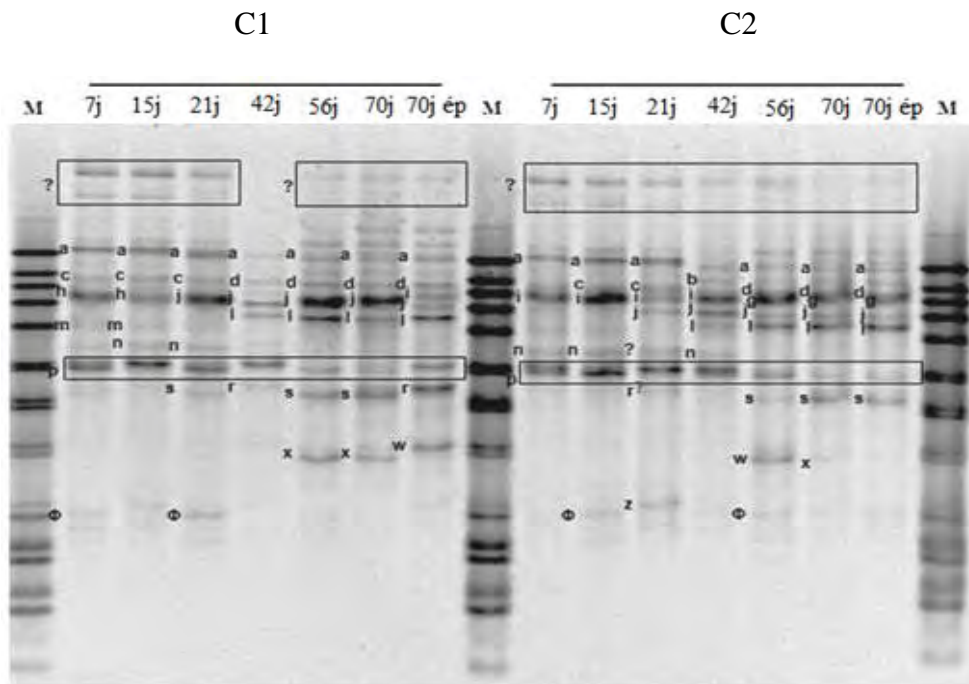


Figure 28: Évolution du profil de la PCR-TTGE de deux fabrications simultanées du fromage *Bouhezza* (C1 et C2) entre 7j et 70j

M, Marqueurs d'ADN génomique de la base de données d'espèces bactériennes de référence (colonne M) (*Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Corynebacterium moorparkense*, *Lactobacillus paracasei*, *Arthrobacterium nicotianae*, and *Brevibacterium casei*).

L'assignation des bandes de la PCR-TTGE des échantillons du *Bouhezza* par rapport aux espèces de bases de références selon PARAYRE *et al.* (2007) est la suivante :

a, *Lb. plantarum/Lb. johnsonni* ou *Lb. gasseri* ; **c**, *Leuconostoc cremoris* ou *Ln. mesenteroides*; **d**, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* ; **h**, *S. xylosus*; **i**, *Lb. brevis* ou *S. Xylosus* ; **j**, *Lb. helveticus/Lb. acidophilus* ou *Lb. Crispatus* ; **l**, *Lb. delbrueckii* subsp. *Lactis* ; **m**, *E. faecalis* ou *S. succinus* ; **n**, *S. gallolyticus* subsp. *Macedonicus* ; **p**, *Lc. Lactis* subsp. *cremoris*; **r**, *Lb. buchneri*; **s**, *B. cereus/B. licheniformis*; **w**, *C. variabil*; **x**, *C. flavescens* ; **Φ**, *Lb. paracasei/Lb. casei/Lb. rhamnosus/Lb. zae* ou *B. infantis* ; ? , bande inconnue.

L'évolution des profils de la PCR-TGGE dans les deux fabrications de *Bouhezza* étudiées, C1et C2, était semblable. Dans les profils plusieurs bandes sont apparues indiquant la présence d'un écosystème bactérien riche et diversifié. Quinze bandes ont été assignées à différentes espèces selon les bases de données des références. Plus précisément, la période s'étalant entre la première et la troisième semaine a été caractérisée par la présence de quatre bandes dominantes et vraisemblablement identifiées selon la base de données à :

- *Lc. lactis*'p',
- *Lb. plantarum* 'a' (ou *Lb. johnsonni* / *Lb. gasseri*)
- *Leuconostoc cremoris/Ln. mesenteroides* 'c',
- et une bande non identifiées ' ?'.

Lc. Lactis et *Lb. plantarum* sont les principales espèces identifiées dans le fromage *Bouhezza* par la PCR-TTGE. L'identification de *Lc. Lactis* a été aussi confirmée par la PCR spécifique sur le gel d'agarose à 1,5% (primer specific PCR). Elle est également l'une des espèces les plus communes trouvées dans les écosystèmes de plusieurs fromages (OGIER *et al.*, 2004). *Lc Lactis* a été identifiée dans plusieurs types de fromages (RANDAZZO *et al.*, 2002 ; FORTINA *et al.*, 2003; ABRIOUEL *et al.*, 2008) et elle dispose d'un pouvoir protéolytique important sur la caséine β (KUNJI *et al.*, 1995).

La présence d'autres espèces semble être liée à l'âge du fromage. A titre d'exemple, une bande assignée à *S. gallolyticus subsp macedonicus* n'a été observée qu'entre 7 et 42j. La bande correspondante à *S. xylosus*'h' et la bande correspondante à *Lb. Brevis/S. xylosus* 'i' ont été détectées à différentes périodes de fabrication-maturation. Tandis que la

bande attribuée à *Lb. Helveticus* n'apparaît qu'à partir de trois semaines de fabrication. *Lb. helveticus* possède un système protéolytique puissant lui permettant la production de peptides courts et la libération d'acides aminés après lyse des caséines. Elle joue un rôle important dans l'affinage des fromages (SAVIJOKI et al., 2006).

Une évolution remarquable dans le profil des bactéries lactiques apparaît après ajout du lait cru dans le fromage. Les profils changent sensiblement entre 42 et 70j marquées par l'apparition de nouvelles bandes et la diminution de l'intensité d'autres. L'intensité de la bande correspondante à *L. plantarum* aussi bien que celle de l'espèce inconnue ' ? ' ont diminué et *Lb. delbrueckii subsp. lactis* '1' a apparu à partir de 42j (Fig. 28).

Une présence intermittente durant les dix semaines de fabrication-maturation a été aussi signalée pour d'autres espèces. C'est de cas des bandes assignées à :

- *Lb. paracasei/Lb. casei/Lb. rhamnosus* 'Φ',
- *Bacillus cereus, Corynebacteriumvariable* 'w',
- *Corynebacteriumflavescens* 'x',
- *B. Cereus* 's',
- *Lb. buchneri* and *Bifidobacterium longum* 'r'.

Les espèces de bactéries corynéformes prévalus après 42 jours. La présence et l'évolution de ces espèces doivent être confirmées par des approches spécifiques (PCR spécifique).

Dans certains cas, la PCR-TTGE ne peut pas confirmer les différences entre les micro-organismes qui ont des positions semblables « co-migration » des bandes. Par exemple, les bandes correspondantes à *S. xylosus* et à *Lb.brevis* sont trop étroites pour être distingués par des comparaisons avec la base de données.

II.1.3. Identification phénotique ou biochimique des bactéries lactiques

L'isolement, la purification et l'identification ont concernés 40 souches (Gram (+), immobiles, catalase (-)) des deux fabrications après énumération dans les milieux M17 et MRS, et ceci aux différents stades de fabrication sur un total de 128 souches isolées. Ces souches se répartissent comme suit 20 coques de S1 à S20 et 20 bacilles de L1 à L20. Les tableaux donnés en Annexe IV illustrent les caractères de chaque souche isolée et identifiée pour les coques et pour es bacilles, respectivement.

Les résultats du classement des espèces que nous avons isolées sont basés sur les travaux des références GUIRAUD (1998). Les bactéries se rapprochant aux différents genres et espèces des coques et des bacilles lactiques rencontrés dans le fromage *Bouhezza* au cours de sa fabrication sont résumés dans les tableaux 11 et 12.

II.1.3.1. Coques lactiques

Les coques lactiques rencontrées dans le fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication sont rassemblé dans le tableau 11. Les coques lactiques sont représentés par cinq genres soit *Leuconostoc* (30%), *Lactococcus* (20%), *Pediococcus* (20%), *Streptococcus* (15%) et *Enterococcus* (15%).

Tableau 11. Bactéries se rapprochant des différents genres et espèces des coques rencontrées dans le fromage *Bouhezza*

Groupes	Genre	Bactéries se rapprochant aux espèces	Souches concernées
Coques	<i>Leuconostoc</i> (30%)	<i>L. mesenteroide subsp mesenteroides</i>	6 souches (S ₂ , S ₃ , S ₅ , S ₈ , S ₁₀ et S ₁₄)
	<i>Lactococcus</i> (20%)	<i>L. lactiscremoris</i>	4 souches (S ₉ , S ₁₂ , S ₁₅ , S ₁₇ , S ₁₉)
	<i>Pediococcus</i> (20%)	<i>P. acidilactici</i>	2 souches (S ₁ et S ₁₃)
		<i>P. pentosaceus</i>	2 souches (S ₇ et S ₁₈)
	<i>Streptococcus</i> (15%)	<i>S. thermophilus</i>	3 souches (S ₂ , S ₁₆ et S ₂₀)
<i>Enterococcus</i> (15%)	<i>E. durans</i>	3 souches (S ₄ , S ₆ et S ₁₁)	

Dans le genre *Leuconostoc* six souches ont été déterminées soit S₂, S₃, S₅, S₈, S₁₀ et S₁₄. Toutes ces souches présentent un développement positif à 10°C, à pH 9,6 et une teneur en NaCl de 4 et 6,5%. Elles sont sensibles à la température et ne dégradent pas la dextrine. Seule la souche S₁₀ est fructose et citrate négatifs. Ces souches ont été appariées aux espèces de *L. mesenteroide subsp mesenteroides*. Elles interviennent dans la production d'acides, participent à la protéolyse et à la lipolyse, et à la production de CO₂ et de composés aromatiques. Elles sont capables de produire l'acétoïne à partir du citrate et interviennent directement dans l'arôme (Mc SWEENEY, 2004 ; LORE *et al.*, 2005). Selon GARABAL (2007), *L. mesenteroide subsp mesenteroides* fait partie de l'écosystème microbien du fromage Greek Anevato. D'autre part, selon CASEY *et al.*, (2006), les

bactéries lactiques indigènes (NSLAB) identifiées dans les fromages sont constituées de quatre groupes : *lacobacilli* mésophiles, *pediococci*, *enterococci* et *Leuconostoc*. La présence de quelques espèces du genre *Leuconostoc* a été signalée dans le fromage Ragusana (RANDAZZO *et al.*, 2002), dans le fromage Epoisses (OGIER *et al.*, 2004) et dans le *Lben* traditionnel tunisien (SAMET-BALI *et al.*, 2012).

Les cinq souches rencontrées dans le genre *Lactococcus* (S₉, S₁₂, S₁₅, S₁₇ et S₁₉) ne résistent pas à la température de 60°C/30 min et ne se développent pas en présence de saccharose, de fructose et de dextrine et ne possèdent pas B galactosidase. Seules les souches S₁₂ et S₁₉ sont mannitol positif. Ces quatre souches ont été rapprochées par leurs caractères à l'espèce *L. lactis cremoris*.

Deux souches rencontrées dans le genre *Pediococcus* (S₁ et S₁₃) ont un développement positif à 45°C, en présence de saccharose et de fructose, ce pendant elles sont lactose négatif. Pour ces raisons elles ont été rapprochées à l'espèce *P. acidilactici*. Les deux autres souches (S₇ et S₁₈) ont par ailleurs les caractères précités opposés, et elles ont été affiliées à l'espèce *P. pentosaceus*. Les pediococques représentent la flore normale des Cheddars affiné. Selon LEJAOUEN (1997) *P. pentosaceus* pourrait oxyder le lactose, peptides et L- et le D-lactate. Equipement varié en aminopeptidases, dipeptidases et protéases intracellulaires

Le genre des *Streptococcus* (15 %) est représenté par trois souches (S₂, S₁₆ et S₂₀). Elles ne se développent pas à 10°C (sauf S₁₆), à pH 9,6, à une teneur en sel de 6,5 % et en présence de mannitol, de fructose, de dextrose et de citrate. Nous avons situé ses souches à l'espèce *S. thermophilus*. Selon RANDAZZO *et al.* (2006) *S. thermophilus* est la souche dominante, dans le fromage Pecorino, après *L. lactis*.

Le reste des souches du groupe des coques lactiques, soit S₄, S₆ et S₁₁ ont été associées par leurs caractères au genre des *Enterococcus* (15%). Ces souches se développent positivement à 10°C et à 45°C, résistent à la pasteurisation, et aux milieux hyper-salé ou basique. D'autre part, elles ne dégradent pas le mannitol, le fructose, la dextrine et le citrate. Ces souches ont été situées avec l'espèce *E. durans*.

II.1.3.2. Bacilles lactiques

Les bactéries lactobacilles rencontrées dans le fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication sont rassemblées dans le tableau 12.

Lactobacillus est le genre le plus important au sein du groupe des bactéries lactiques. Basée sur les séquences d'ARNr 16S, les lactobacilles sont phylogénétiquement répartis en sept groupes : *lb buchneri* (bu), *lb casei* (ca), *lb delbrueckii* (de), *lb plantarum* (pl), *lb reuteri* (re), *lb sakei* (sa) et *livres salivarius* (sl). Traditionnellement, le genre est divisé en trois groupes selon les voies de fermentation des hydrates de carbone: (1) homofermentaire et hétérofermentaires obligés (2) facultative (3) lactobacilles hétérofermentaires obligés (De ANGELIS et GOBBETTI, 2011).

Concernant le groupe des bacilles lactiques du fromage *Bouhezza*, nous avons recensé dans un premier groupe 7 souches (L₄, L₆, L₁₁, L₁₄, L₁₆, L₁₇ et L₁₈) qui ne se développent pas à 45°C, et qui fermentent la plus part des sucre (lactose, mannitol, saccharose, maltose, fructose et glucose). Seules les souches L₁₄ et L₁₈ n'utilise pas la dextrine. Ces souches se rapprochent à l'espèce *L. casei/Pseudo-plantarum* (35 %). Ceci, confirme nos résultats de l'identification par la PCR-TTGE, où la bande Φ , correspondante *Lb. paracasei/Lb. casei/Lb. rhamnosus* a été identifiée. Selon GARABAL (2007), les souches suivantes font partie de la flore lactiques indigène des fromages : *Leuconostoc* spp., *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius*, et *Lb. rhamnosus*.

Tableau 12. Bactéries se rapprochant du genre *Lactobacillus* dans le fromage *Bouhezza*

Groupes	Genre	Bactéries se rapprochant aux espèces	Souches concernées
		<i>Lactobacillus casei/Pseudo-plantarum</i> (35%)	7 souches (L ₄ , L ₆ , L ₁₁ , L ₁₄ , L ₁₆ , L ₁₇ et L ₁₈)
Bacilles	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> groupe <i>Thermobacterium</i> (25%)	5 souches (L ₁ , L ₅ , L ₉ , L ₁₀ et L ₁₅)
		<i>Lactobacillus brevis</i> groupe <i>betabacterium</i> (20%)	4 souches (L ₂ , L ₇ , L ₁₃ , L ₂₀)
		<i>Lactobacillus sake</i> (20%)	4 souches (L ₃ , L ₈ , L ₁₂ , L ₁₉)

Le deuxième groupe rassemble 5 souches (L₁, L₅, L₉, L₁₀ et L₁₅) thermophiles et qui ne se développe pas à 10 °C (sauf L₅ et L₁₅) et à 15°C. Ces souches n'utilisent pas le mannitol et la dextrine, elles ont été rapprochées à l'espèce *L. acidophilus* groupe *Thermobacterium* (25%).

Le troisième groupe de ces bactéries concerne 4 autres souches (L₂, L₇, L₁₃, L₂₀) qui se développent à 10 °C (sauf L₂₀) et à 15°C mais pas à 45°C. Ces souches fermentent le saccharose, le fructose et le glucose et sont le seul groupe hétéro-fermentaire. Nous les avons rapprochés à l'espèce de *L. brevis* groupe *Betabacterium* (20%).

Les souches du quatrième groupe (L₃, L₈, L₁₂, L₁₉) présentent des caractères semblables aux souches du troisième groupe mais utilisent en plus le maltose et sont homo-fermentaires. Ces souches sont comparables par leurs caractéristiques biochimiques à l'espèce *Lb. sake* (20%).

Conclusion partielle

Durant toute la période de la fabrication-maturation, les comptes des bactéries lactiques indigènes (lactobacilles et lactocoques) et des levures-moisissures sont restés presque stables (soit respectivement de 6 à 7 log ufc/g et de 5 à 6 log ufc/g).

Dans l'écosystème de *Bouhezza*, il y avait également une diversité bactérienne considérable confirmée par la PCR-TTGE et l'identification phénétique.

Selon la PCR-TTGE, quelques espèces ont été détectées toutes au long de la fabrication-maturation (*Lc. Lactis*, *Lb. Plantarum* et *Leuconostoc cremoris*/*Ln. mesenteroides*), d'autres au début de la maturation (*S. gallolyticus subsp macedonicus*) ou seulement détectées après additions de lait cru (*Lb. delbrueckii subsp. lactis*). Les conditions hygiéniques pendant la fabrication et la maturation sont nécessaires pour obtenir un produit de bonne qualité ceci est confirmé par l'absence de bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, and *E. coli* O157H7).

D'après les résultats de l'identification phénétique, le genre *Lactobacillus* est le genre dominant des bactéries lactiques dans le *Bouhezza*. Les coques identifiées appartiennent à cinq genres (*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* *Enterococcus*). Ces espèces doivent intervenir dans l'affinage de notre fromage vu l'effet particulier de chacune, et parfois l'une complète l'autre.

II.2. Composition physicochimique de *Bouhezza*

Dans ce qui suit, tous les échantillons de ferme et de laboratoire ont fait l'objet de caractérisation physicochimique dans le but de bien situer le fromage.

II.2.1. Teneur en matière sèche, en matière grasse et en protéines

Les résultats de la composition globale en extrait sec total (EST), matière grasse (Gras) et matière protéique du fromage *Bouhezza* sont illustrés par les tableaux 13 et 14, respectivement des échantillons de ferme et d'expérimentation. Les teneurs en matière sèche et matière grasse sont les principaux paramètres utilisés dans la classification des fromages.

Il ressort du tableau 13 que la teneur la plus faible en EST des *Bouhezza* de ferme est de $23,38 \pm 2,12$ g/100 g de fromage avec un âge d'affinage correspondant à 30 j.

Tableau 13 : Composition physicochimique du fromage *Bouhezza* de ferme

	Durée d'affinage				
	30 j (n= 3)	40 j (n=5)	60 j (n=6)	75 j (n=4)	90 et plus (n=4)
EST	23,38 ± 2,12	26,32 ± 5,06	29,18 ± 8,32	31,31 ± 7,53	31,26 ± 6,05
MG/EST	31,34 ± 6,34	27,65 ± 7,90	30,86 ± 5,50	34,13 ± 8,01	39,06 ± 8,07
Prot/EST	53,02 ± 9,89	46,44 ± 12,40	54,45 ± 6,98	43,51 ± 14,30	47,07 ± 7,50
TEFD	82,70 ± 1,87	79,42 ± 4,78	77,59 ± 8,23	76,66 ± 7,88	78,53 ± 2,39

n : nombre d'échantillons de *Bouhezza* de ferme; EST : extrait sec total, MG : matière grasse ; PRO/EST : taux de protéines rapporté à l'extrait sec ; TEFD : taux de l'eau dans le fromage dégraissé.

Cette teneur est confirmée dans les résultats des fabrications contrôlées où l'EST à quatre semaines augmente jusqu'à $24,97 \pm 6,21\%$ g/100 g (Tab. 14). Nous rappelons ici, que selon les déclarations des familles enquêtées, le fromage *Bouhezza* ne peut être consommé qu'après un mois de fabrication. L'augmentation progressive de la teneur en matière sèche avec l'âge d'affinage a été notée dans les fromages de fermes et d'expérimentation. Dans ces derniers échantillons la teneur maximale est atteinte à 70 j (Tab. 14), elle est de $35,15 \pm 2,14$ g/100 g. En effet, les perforations de la *Chekoua* de *Bouhezza* permettent l'égouttage continu du lactosérum qui entraîne avec lui une partie des constituants solubles (sel, acide lactique et autres). L'extrait sec maximal enregistré entre les *Bouhezza* de ferme et de fabrications contrôlées est proche, il est de $31,26 \pm 6,05$ et de $35,15 \pm 2,14$ g/100 g, respectivement.

Tableau 14 : Composition physicochimique du fromage *Bouhezza* de fabrications contrôlées

	Durée d'affinage (jours)				
	28j	42j	49j	56j	70j
EST	24,97 ± 6,81	25,51 ± 4,58	29,51 ± 0,49	30,04 ± 1,55	35,15 ± 2,14
MG/EST	16,24 ± 6,38	17,84 ± 6,98	21,17 ± 1,11	30,04 ± 3,42	35,23 ± 6,29
Prot/EST	51,2 ± 7,82	56,77 ± 6,69	58,23 ± 8,71	49,24 ± 7,61	52,97 ± 6,02
TEFD	78,32 ± 5,39	78,16 ± 3,27	75,19 ± 0,2	76,89 ± 1,89	74 ± 3,11

EST : extrait sec total, MG : matière grasse ; PRO/EST : taux de protéines rapporté à l'extrait sec, TEFD : taux de l'eau dans le fromage dégraissé.

En comparaison avec d'autres fromages affinés dans les sacs en peaux de chèvre, *Tulum* et *Darfiyeh* dont l'EST est respectivement entre 55-60 % et 45-50 % (HAYALOGLU *et al.*, 2007 a; SARHAN, 2010), l'EST de *Bouhezza* est moindre. Dans ces fromages les peaux sont utilisées pour l'affinage du caillé qui a déjà subi un égouttage.

Concernant la teneur en matière grasse dans le *Bouhezza* de ferme, elle augmente en fonction de la durée d'affinage passant de $7,34 \pm 1,76$ à $12,57 \pm 5,15$ g/100 g du fromage frais et de $27,65 \pm 7,90$ à $39 \pm 8,07$ g/100 g dans la matière sèche. En parallèle, cette augmentation est confirmée dans les fabrications contrôlées. Du jour 28 au jour 70, le taux du Gras/Sec est passé de $16,24 \pm 6,38$ % à $35,23 \pm 6,29$ /100 g. La période entre 0j et 42j jours a été caractérisée par l'ajout successif d'un *Lben* partiellement écrémé. Cependant, et après avoir lancé les ajouts en lait entier, à 42j, le niveau de Gras/Sec a haussé de manière significative. En effet, la *Chekoua* de *Bouhezza*, qui est perméable à la phase aqueuse, est complètement imperméable à la matière grasse. Les résultats donnés pour les teneurs en extrait sec total et en Gras/Sec des *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation nous permettent de confirmer en partie le diagramme adopté de la fabrication de *Bouhezza*.

En dernier, la teneur en protéines des *Bouhezza* de ferme varie entre $12,22 \pm 0,62$ % et $15,88 \pm 0,58$ g/100 g de fromage et celle d'expérimentations entre $12,78 \pm 0,53$ et $18,63 \pm 0,12$ g/100 g de fromage. Cependant, l'évaluation de cette teneur par rapport à la matière sèche des *Bouhezza* de ferme montre qu'elle varie entre $43,51 \pm 14,30$ et $54,45 \pm 6,98$ g/100 g. Concernant les *Bouhezza* des fabrications contrôlées, cette teneur est entre $49,24 \pm 7,61$ g/100 g et $56,77 \pm 6,69$ g/100 g.

Par rapport aux fromages en peaux de chèvre, le niveau de Gras/Sec de *Bouhezza* est proche de celui du *Darfiyeh* (SERHAN, 2010) et plus faible que celui du *Tulum*

(BAYAR et ÖZRENK, 2011). Cependant la teneur en protéines est aussi moindre (KALIT *et al.*, 2010). Ces différences sont dues principalement aux technologies de fabrication distinctes entre ces fromages et *Bouhezza*.

II.2.2. Le pH et la teneur en lactate et en chlorures

La figure 29 montre les valeurs moyennes du pH et de la teneur en acide lactique et en chlorures du fromage *Bouhezza*.

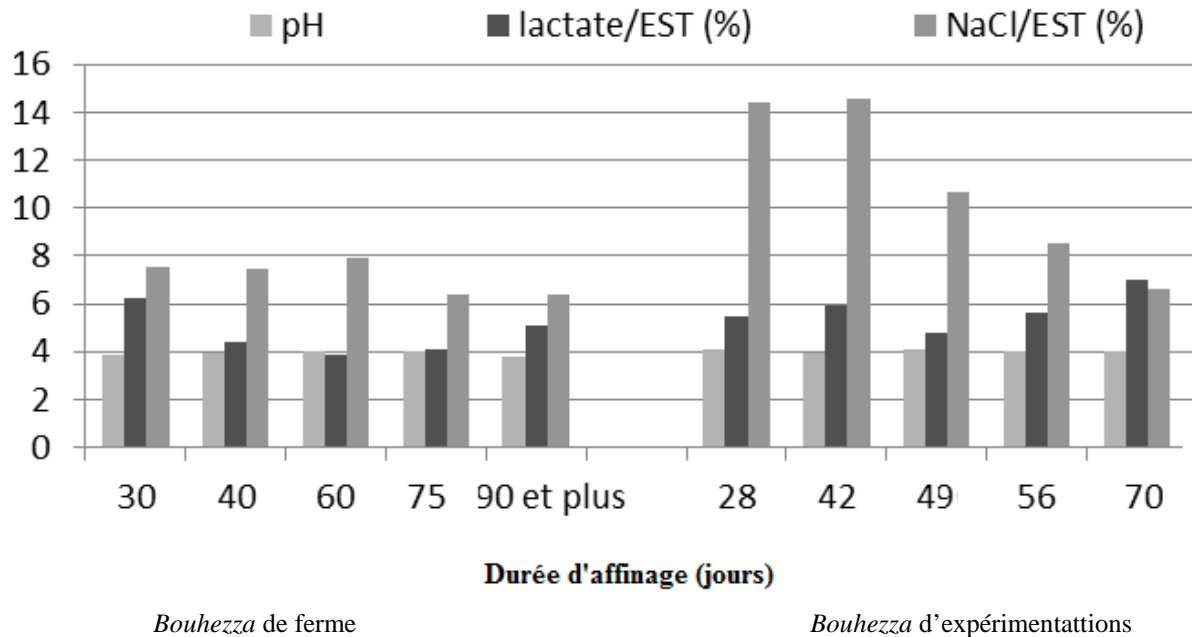


Figure 29 : Le pH et les teneurs en lactates et en chlorures du fromage *Bouhezza*

Le pH des différents échantillons de *Bouhezza* quel que soit l'origine ou l'âge d'affinage se situe entre 3 et 4. Aussi, la teneur en acide lactique est entre $4,15 \pm 1,58$ g/100 g et $6,29 \pm 1,51$ g/100 g de l'EST des fromages de ferme et entre $4,74 \pm 0,23$ % et $6,93 \pm 3,26$ g/100 g de l'EST des fromages d'expérimentation. Ces caractéristiques de la pâte du fromage *Bouhezza* reflètent le caractère acide du fromage, favorisant une sélection des microorganismes à l'intérieure de la pâte. Selon PEREZ PACHECO et BUCIO GALINDO (2011), le bas pH des fromages acides empêche le développement des bactéries pathogènes. Les principaux pathogènes concernés sont *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et quelques espèces pathogènes d'*E. coli* (KASRAZADEH et GENIGEORGIS, 1994 cité par PEREZ PACHECO et BUCIO GALINDO (2011). Ceci est en rapport avec nos résultats de la partie microbiologique où nous avons prouvé l'absence de ces pathogènes dans l'ensemble des échantillons analysés.

La teneur en sel du *Bouhezza* de ferme est de 6 à 7 g/100 g de la matière sèche. Pour les fromages des fabrications contrôlées, cette teneur augmente jusqu'à 42 j pour atteindre une valeur de $14 \pm 0,70$ g/100 g dans l'EST. Toutefois, et après l'ajout du lait cru entier, cette teneur diminue en fin d'affinage (70j) à une valeur finale de $6,65 \pm 1,73$ g/100g de la matière sèche. Il est à rappeler que l'ajout du lait cru permet donc la correction de cette salinité durant la fabrication, comme il est déjà signalé par les résultats d'enquête. Selon FOX *et al.* (2000), la teneur en sel dans la plupart des fromages est entre 1 et 2% de fromage ; en comparaison avec le *Bouhezza*, cette teneur fluctue entre $1,77 \pm 0,35$ et $2,26 \pm 0,51$ g/100 dans les fromages de ferme et entre $3,66 \pm 1,22$ et $2,22 \pm 0,80$ g/100 g dans les fromages d'expérimentations. Notre *Bouhezza* est caractérisé par une salinité légèrement plus prononcée que celle des autres fromages puisque le sel est ajouté non seulement pour le goût mais aussi pour contrôler la fabrication et est corrigé à la fin par l'ajout du lait cru. Le test de corrélation au seuil de 5 % a montré que l'évolution de la teneur en sel est négativement significatif avec la flore totale mésophile (r de Pearson - 0,842 ; $p < 0,05\%$) et avec le pH (-0,859 ; $p < 0,05\%$). Ceci montre l'effet direct de ces paramètres sur le développement des microorganismes tel qu'il est rapporté par PEREZ PACHECO et BUCIO GALINDO (2011) dans les fromages à pH inférieur à 4,6.

Un dernier paramètre à signaler est l'activité de l'eau dans le fromage *Bouhezza*. Ce paramètre a été évalué seulement dans les fabrications contrôlées. Les résultats montrent que l'activité de l'eau (a_w) a été de 0,74 -0,80 au cours des premières semaines, ensuite, et après ajout du lait cru elle augmente à 0,95 à 56j puis à 0,97 en fin d'affinage (70j). Selon MARCO (1993), l' a_w joue un rôle central dans les fromages puisqu'elle influence sa qualité, sa stabilité et sa sécurité ; et elle dépend de plusieurs caractéristiques du fromage (teneur en sel, en cendres, et NNP, pH). Elle varie entre 0,7 et 0,9 dans différents types de fromages (MARCO, 1993).

II.2.3. Classification de *Bouhezza* selon le *Codex Alimentarius*

Selon la directive CODEX STAN A-6 (1978) du *Codex Alimentarius*, les fromages de ferme sont classés dans la catégorie des fromages mi molle, alors que les fromages de fabrication (entre quatre et 10 semaines d'affinage) où nous avons une évolution de la composition, le *Bouhezza* passe de la catégorie des fromages à pâte molle à celle des fromages à pâte mi-molle (TEFD de 61 à 69 % demi molle ou > 67 pâte molle) (Fig. 30).

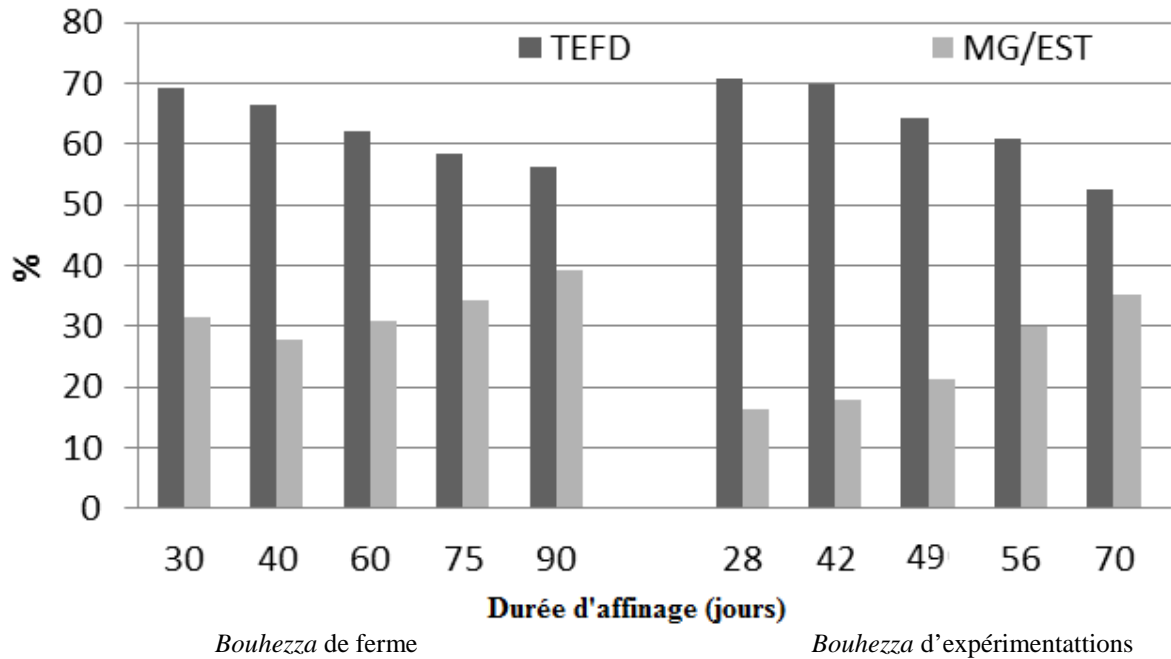


Figure 30 Paramètres de classification du fromage *Bouhezza* selon le *Codex Alimentarius*

Aussi, tous les échantillons de ferme ou d'expérimentations sont classés dans la catégorie des fromages mi-gras (MGES de 25 à 45).

II.2.4. Comparaison des échantillons par l'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales des données expérimentales des caractéristiques physicochimiques des échantillons de *Bouhezza* (de ferme et de fabrications contrôlées) dont la durée d'affinage est d'au moins 4 semaines a permis de dégager certaines remarques. Rappelons que cette analyse permet de représenter visuellement des individus « p » en fonction de « n » variables. Les représentations graphiques des directions des axes 1 et 2 sont déterminées de manière à disperser au maximum les individus en fonction des données recueillies. Les projections sur les axes des corrélations entre les variables et les axes (représentées en flèches) permettent de situer les individus les uns par rapport aux autres en fonction de l'ensemble des variables qui les caractérisent. Dans notre cas « p » est égale à 52 échantillons de *Bouhezza* (de ferme et de fabrications contrôlées) et 7 variables (EST, MG/EST, TEFD, Protéines/EST, NaCl/EST, pH et Lactates). La figure suivante (Fig. 31) montre que l'axe 1 qui donne 37,07 % de l'information, est essentiellement déterminé par la teneur en EST et en TEFD et l'axe 2 présente 25,42 % des informations par la teneur en MG/EST et en NaCl/EST.

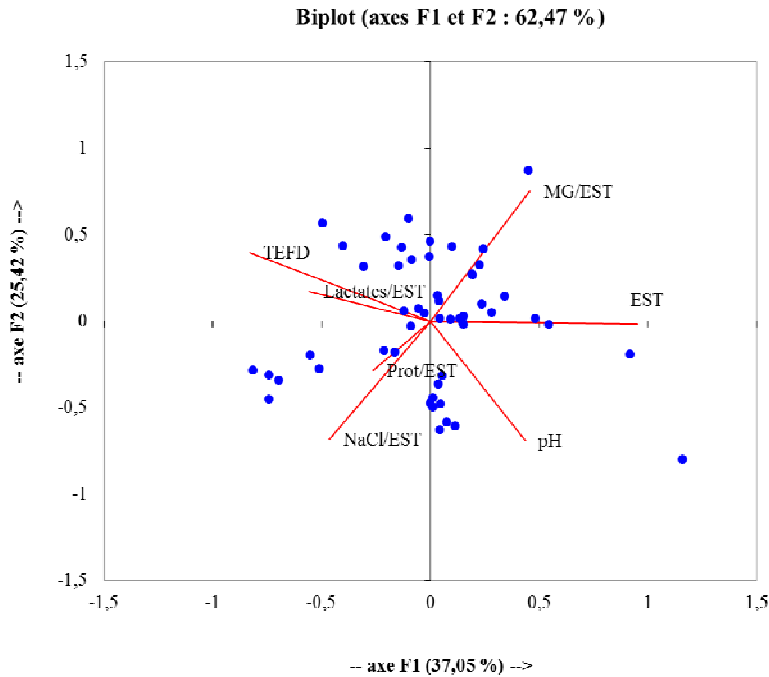


Figure 31 : Différentiation des échantillons du fromage *Bouhezza* et mise en évidence de la variabilité entre eux par analyse en composantes principales

D'autre part, la classification basée sur cette analyse, a permis de ressortir trois classes du fromage *Bouhezza*. Les caractéristiques moyennes de ces trois classes sont données dans le tableau 15.

Tableau 15 : Répartition des échantillons de *Bouhezza* de fermes et d'expérimentations par analyse en composantes principales

	Classe 1 (n=33)		Classe 2 (n=13)		classe 3 (n=6)	
EST	28,96 ±	4,51	33,2 ±	5,53	20,16 ±	2,18
MG/EST	33,43 ±	6,87	23,3 ±	4,79	13,58 ±	7,80
TEFD	78,72 ±	3,36	72,4 ±	4,43	82,18 ±	1,19
Protéines/EST	50,88 ±	8,47	50,9 ±	9,63	54,94 ±	10,41
NaCl/EST	7,35 ±	1,95	11,3 ±	3,68	14,31 ±	1,53
Lactates/EST	5,66 ±	1,41	3,9 ±	1,07	8,39 ±	2,02

Paramètres en g/100g ; TEFD : pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraissé

- **La classe 1 « classe du *Bouhezza* avec le taux de matière grasse le plus élevé, et de sel le plus faible »**

Elle regroupe 33 échantillons du fromage *Bouhezza* soit de 19 échantillons de ferme et 14 échantillons des fabrications contrôlées à différentes périodes d'affinage [30j (n=3), 45j (n=3), 40j (n=4), 56j (n=6), 60j (n=5), 70j (n=8) 75j (n=3), 90j (n=1), 120j (n=1) et 150j (n=2)]. Cette classe est caractérisée par un EST moyen d'environ 29 g/100g et une teneur en Gras/Sec la plus élevée de 33,5 g % g. La teneur en sel dans le *Bouhezza* de cette classe est la plus faible.

- **La classe 2 « classe du *Bouhezza* avec un taux d'extrait sec le plus élevé, et un taux de matière grasse et de sel moyennes»**

Trois échantillons de ferme et 10 échantillons de fabrications contrôlées sont regroupés dans cette classe. L'affinage de ces échantillons est entre 28 et 75j [28j (n=3), 40j (n=1), 42j (n=3), 49j (n=3), 60j (n=1), 70j (n=1) 75j (n=1)]. Les échantillons sont caractérisés par la teneur la plus élevée en EST et la teneur moyenne en G/S, respectivement de 33 et 23 g/100g.

Il est à noter que la plus part des échantillons des fabrications contrôlées sont réparties dans les classes 1 et 2 avec les échantillons de ferme.

- **La classe 3 « classe du *Bouhezza* avec un taux d'extrait sec et de matière grasse les plus faibles, et le taux de sel le plus élevé»**

La dernière classe est constituée par six échantillons des fabrications contrôlées avant l'ajout du lait cru soit entre 28 et 42j. Elle est caractérisée par les teneurs en EST et en MG les plus faibles, respectivement de 20 g/100g et 13,5 g/100g de Gras/Sec).

D'autre part et malgré les différences qui existent entre ces trois classes, la classification du *Codex Alimentarius*, ne permet pas de les différencier. Les trois classes de *Bouhezza* sont placées dans la catégorie des fromages à pâtes molles et migras.

Ainsi, les variables les plus importantes pour une homogénéisation des échantillons du fromage *Bouhezza*, et principalement ceux de ferme, sont la teneur en matière sèche et en matière grasse. Comme montré dans la partie évolution de la composition physicochimique du fromage *Bouhezza*, l'extrait sec ne peut atteindre 20 % qu'après au moins 4 semaines de fabrication. Il serait intéressant de fixer une teneur minimale en EST et G/S, pour un *Bouhezza* à affinage court. L'extrait sec du fromage doit être prédéfini pour permettre de différencier les fromages jeunes de ceux affinés plus longtemps confirmé par la teneur en matière grasse. Dans le cas de cette étude, cette différence semble difficile

puisque dans les différentes classes, les durées d'affinage se chevauchent. La teneur en matière grasse informe sur l'ajout du lait cru pour finaliser la maturation du fromage. Dans une projection de préservation de ce fromage par une réglementation rigoureuse, il devient primordial de maîtriser ces deux paramètres avec les fermiers.

II.3. Protéolyse et lipolyse du fromage *Bouhezza*

La protéolyse du fromage *Bouhezza* a été d'abord initiée par l'étude des concentrations de l'azote soluble à pH 4.6-SN et de l'azote non protéinique (TCA-SN) par rapport à l'azote total (TN) et ensuite par UREA-PAGE dans des fromages de ferme et des fabrications contrôlées durant 70 jours. Le travail réalisé en collaboration avec SAOUDI (2012), complète une partie de l'étude de la protéolyse du *Bouhezza* de ferme avec urea-PAGE et RP-HPLC (Revers - High Performance Liquid Chromatography).

II.3.1. Evolution des indices de maturation

Le taux de maturation du fromage *Bouhezza* de ferme ou de fabrication contrôlées, semble variable d'un échantillon à un autre (Tab. 16 et Fig. 32).

Tableau 16 : Taux de maturation (NS à pH 4,6) dans le *Bouhezza* de ferme

	Durée d'affinage (jours)				
	30 j	40 j	60 j	75 j	90j et plus
Prot/EST	53,02 ±9,89	53,97 ±1,14	52,70 ±8,27	43,51 ±14,30	47,07 ±7,50
NST/NT	7,85 ±0,64	8,57 ±0,11	11,61 ±2,78	12,14 ±4,40	11,99 ±3,69

NST/NT : l'azote soluble à pH 4,6-SN (pH 4.6-SN) par rapport à l'azote total (TN)

En comparaison avec d'autres fromages où la protéolyse est renforcée par les enzymes de coagulations, le taux de protéolyse dans le *Bouhezza* est faible à moyen. Dans les fromages de ferme, la protéolyse varie entre $7,85 \pm 0,64$ à $12,14 \pm 4,40$ % d'NS rapporté à NT. Aussi, la fraction de l'azote non protéinique (NNP) rapportée fluctue entre 5,66 et 13,67 %.

Dans les fabrications contrôlées, l'étude des changements des indices de maturation de *Bouhezza* durant la période de maturation de 70j montre une évolution différente dans l'azote soluble à pH 4,6-SN et dans l'azote non protéinique (TCA-SN) par rapport à l'azote total (TN), comme il est présenté en figure 32.

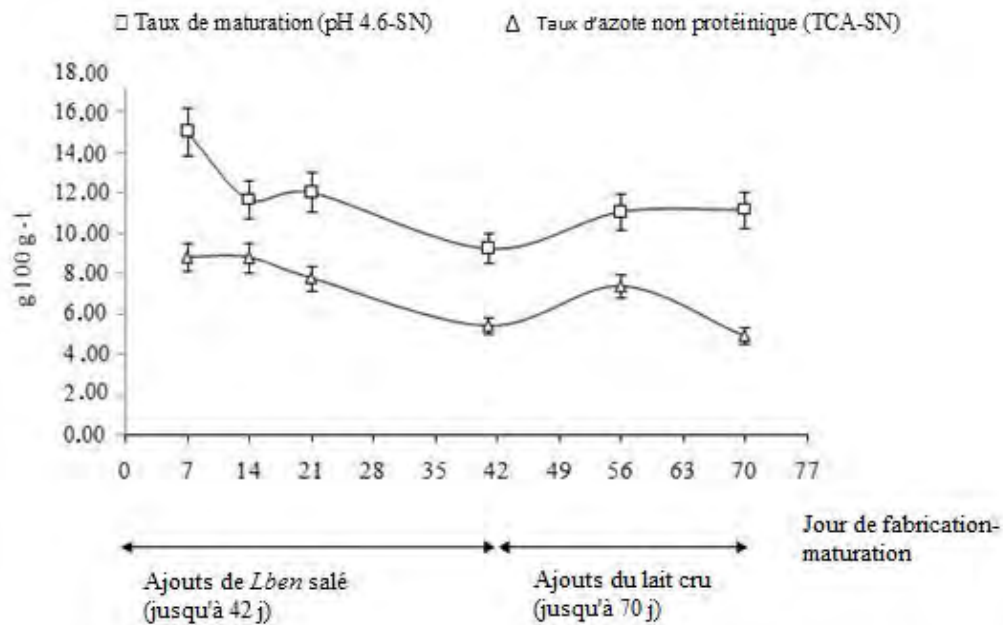


Figure 32. Evolution des indices de protéolyse dans le fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication-affinage (70j)

Le taux de maturation du fromage était assez important durant la première semaine de fabrication (15 % d'NS pH 4,6 rapporté à NT) suivie par une diminution considérable jusqu'à 42 j (9,2 % d'NS pH 4,6 rapporté à NT). En parallèle, nous avons noté que la fraction de l'azote non protéinique était constante pendant les deux premières semaines (8,8 % NS-TCA rapporté à NT) puis elle a légèrement diminué jusqu'à 42j (5,4 % NS-TCA rapporté à NT). Après cette période, les ajouts de lait cru semblent stimuler l'augmentation du taux de maturation et du taux de l'azote non protéinique.

En comparaison, avec la bibliographie, le taux de protéolyse est différent d'un fromage à un autre et il varie selon la durée d'affinage du fromage. La maturation de *Bouhezza* se rapproche de celle du fromage *Ahmado de Aliva* chiffrée à $16,6 \pm 6,56$ % d'NS pH 4,6 rapporté à NT et de $8,22 \pm 3,06$ NS-TCA rapporté à NT (FRANCO *et al.*, 2001) et à celle du fromage *Tulum* (PAPPA *et al.*, 2006) ; mais elle est plus faible que celle du fromage italien *Prato* (21,4 % d'NS d'NS pH 4,6 rapporté à NT et 12,5% NS-TCA rapporté à NT) (GOROSTIZA *et al.*, 2004). Dans le *Darfiyeh* le taux de protéolyse varie entre 8,8 et 20% entre 20 et 60j d'affinage (SERHAN *et al.*, 2010). Dans le Feta le taux varie de 17% à 20% entre 2 et 6 mois de maturation (SARANTINOPOULOS *et al.*, 2002 ; MICHAELIDOU *et al.*, 2003). Le Cheddar, qui est le fromage le plus étudié, présente des valeurs d'environ 20% à 25% après 4 mois d'affinage (REHMAN et FOX, 2002).

Le procédé de fabrication de *Bouhezza* est particulier. Il est basé sur les ajouts successifs de *Lben* et de lait cru sans ajout d'enzymes pour la coagulation et un égouttage continu. De ce fait, la protéolyse est générée seulement par deux phénomènes : les enzymes natives du lait cru, du *Lben* et les enzymes d'origine microbiennes de la flore indigène du *Bouhezza* ou de la *Chekoua*, dont les bactéries lactique. Selon la bibliographie, les principales enzymes indigènes du lait sont la plasmine (protéase alcaline), et la cathepsine D (protéase acide) (KELLY *et al.*, 2006). Aussi, les bactéries dotées d'un pouvoir protéolytique peuvent activer à la fois par leurs enzymes extracellulaires, qui sont liées à leurs enveloppes ou libérées dans le lait-caillé, ou par leurs enzymes intracellulaires libérées après leur lyse (LORTAL *et al.*, 2005). Aussi, il est probable qu'une quantité des fractions d'azote soluble est éliminée avec le lactosérum exsudé à travers les perforations de la *Chekoua*. Une évaluation de ces indices (pH 4,6-SN et TCA-SN) dans le lactosérum serait intéressante.

Vu les résultats des indices de protéolyse dans le fromage *Bouhezza*, de ferme ou de fabrications contrôlées, nous pouvons considérer que l'action des enzymes microbiennes est très importante dès le début de la fabrication du fait que le *Lben* a déjà été le siège de réactions protéolytiques. Lors de son étude sur le *Lben* algérien (de préférence au début), HARRATI (1974), a noté une sédimentation constante et assez rapide des caséines du lait lors de du barattage, accompagnée d'une exsudation du sérum qui sont probablement dues au déséquilibre salin provoqué par le mouillage et aux forces de barattage.

II.3.2. Evolution de la protéolyse par UREA-PAGE

Le profil de la protéolyse dans le fromage *Bouhezza* vu par l'électrophorèse sur gel urea-PAGE) de la fraction insoluble à pH 4,6 est représenté dans les figures 33 et 34, respectivement pour le *Bouhezza* de ferme et de fabrications contrôlées. Le profil électrophorétique sur urea-PAGE montre deux bandes principales celles de la caséine α_2 et de la caséine β avec des migrations différentes correspondantes aux caséines natives du lait. Le groupe de la caséine α_s a semblé subir une hydrolyse plus intense que celui de la caséine β . Ceci joint la bibliographie où la plus faible migration correspond au groupe de la caséine β à l'opposé de la caséine α_s (SOUSSA et MALCATA, 1997).

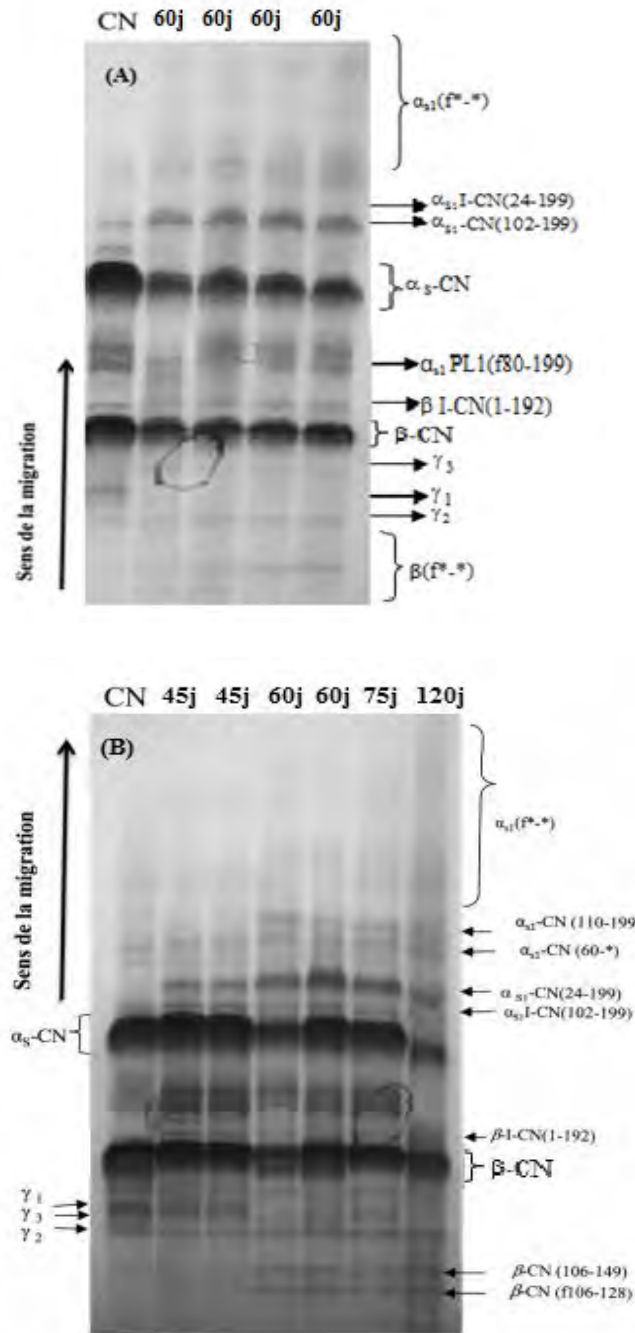


Figure 33. Urée-PAGE de la fraction insoluble à pH 4,6 de *Bouhezza* de ferme

(A) 1, 2, 3, et 4 échantillons de *Bouhezza* de différentes fermes à 60j d'affinage, (B) *Bouhezza* de ferme selon SAUDI (2012). CN : caséine bovine entière utilisée comme étalon de référence.

Les figures 33 et 34, montrent que dans la caséine native (CN) trois peptides avec une faible migration électrophorétique ont été détectés. Selon leur position, ils ont été identifiés dans d'autres travaux comme les fragments de β -NC (f29-209) (γ_1 CN), β -NC (f106-209) (γ_2 CN), et β -NC (f108-209) (γ_3 CN) (FALLICO *et al.*, 2004). Ces trois peptides surgissent après action de la plasmine du lait sur la β -caséine. Durant l'affinage de

Bouhezza, nous avons noté une diminution de l'intensité de la bande correspondante à la caséine γ (γ CN), ceci pourrait être expliquée par l'action hydrolytique des enzymes bactériennes du fromage.

Aussi, trois autres peptides β (f*-*) ont été marqués avec des migrations plus lente que γ CN. Ces fragments peuvent être générés suite à la dégradation de la caséine β sous l'action de la plasmine ou des protéinases microbiennes ayant une affinité à la trypsine (FALLICO *et al.*, 2004). D'autre part, un autre fragment identifié comme α_{s1} (f80-199) (α_{s1} -PL1) se situant entre les bandes de la caséine α_s et de la caséine β a été également détecté. Selon ADDO *et al.* (1995), ce fragment résulte de l'action de la plasmine sur la caséine α_{s1} .

En ce qui concerne les bandes localisées au-dessus de la caséine α_s , ils ont les mêmes positions que celles de α_{s1} - (f24-199) (α_{s1} -1) et α_{s1} - (f102-199). Selon la bibliographie, ils sont produits suite à l'action de la chymosine sur la caséine α_{s1} (MULVIHILL et FOX 1979). Comme il est montré en figures 33 et 34, les bandes de ces fragments sont plus intenses à la fin de l'affinage où la teneur en sel dans le fromage diminue. En effet, la production de ces fragments est liée avec la teneur en sel du milieu (Mc SWEENEY *et al.*, 1993).

En complément avec nos résultats sur le *Bouhezza* de ferme, l'étude réalisée en collaboration avec SAOUDI (2012) a montré que la protéolyse primaire dans le fromage de ferme libère aussi les fragments caséiniques identifiés comme β -CN (f106-128), β -CN (106-149) et α_{s1} CN (110-199), α_{s1} CN (60-*) (Fig. 33, B) .

Le résultat de l'étude de l'évolution du profil de la protéolyse dans le *Bouhezza* d'expérimentation est illustré en figure 34. La comparaison des gels des deux fabrications (C1 et C2) durant les dix semaines de fabrication-affinage, révèle un changement dans le profil à la suite de l'ajout du lait cru à partir de j=42. Cet ajout a induit une diminution de l'acidité et de la teneur en sel du fromage et par conséquent une stimulation de l'action des protéases. La concentration en sel a diminué de 14,86 g 100 g⁻¹ à 10,87 g/100g dans l'extrait sec total entre 42 et 56j. Le lait cru a vraisemblablement favorisé davantage l'activité enzymatique ayant par conséquence une augmentation de l'hydrolyse, comme démontré par la disparition du peptide placé juste sous la β -caséine (f106-209) (γ_2 CN). Ce peptide peut être sélectivement hydrolysé par les protéases bactériennes.

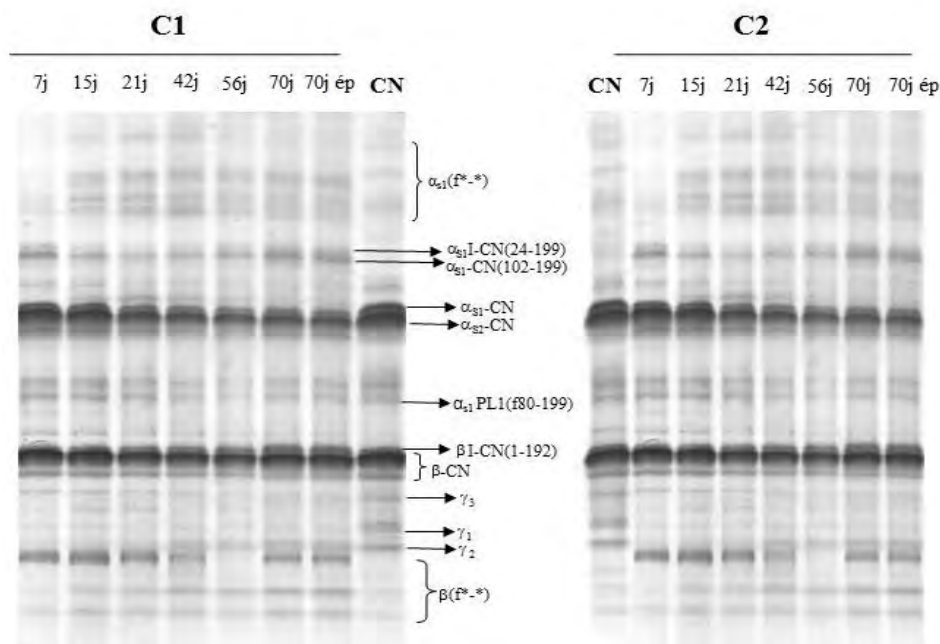


Figure 34. Evolution du profil de la protéolyse par urea-PAGE de la fraction insoluble à pH 4,6 des fabrications contrôlées de *Bouhezza* (C1 et C2) durant 70j. (CN) : caséine bovine entière utilisée comme étalon de référence.

Cette protéolyse primaire est assurée par les enzymes originaires du lait telle que la plasmine ou par sa flore indigène et/ou celle de la *Chekoua* vu que les enzymes de coagulation ne sont pas impliquées dans la fabrication du *Bouhezza*.

Dans le fromage *Tulum* l'urea-PAGE a montré qu'après 120j d'affinage, la caséine β est demeurée presque intacte alors que la caséine α a été partiellement hydrolysée (HAYALOGLU *et al.*, 2007 a, b). Aussi, dans le *Darfıyeh*, la protéolyse touche principalement la caséine α_s (SERHAN, 2010). Dans d'autres fromages turcs, la protéolyse est plus intense au niveau de la caséine α , cependant, la caséine β est hydrolysée dans seulement les fromages à pH élevé (HAYALOGLU et KARABULUT, 2013).

D'autre part, l'étude réalisée en collaboration avec SAOUDI (2012) des trois fractions d'azote (solubles à pH 4,6, soluble et insoluble dans l'éthanol à 70%) par l'RP-HPLC a montré que seule la fraction insoluble dans l'éthanol donnait des chromatogrammes similaires caractérisés par des pics semblables. Ces trois fractions sont caractérisées par un faible pourcentage en acides aminés par rapport aux peptides. Les peptides hydrophiles sont plus importants dans la fraction soluble à pH 4,6 et dans l'éthanol la part des peptides (respectivement entre 40,1- 54,5 % et entre 45,8-52,6 %). Ce pendant les acides aminés libres présentent 8,49% et 14,13 (SAOUDI, 2012). Suite à ces recherches, le résultat

obtenu sur le fromage *Bouhezza* correspond à une protéolyse limitée ou à une diminution du taux des acides aminés par perte dans le lactosérum continuellement éliminé à travers les perforations de la *Chekoua*. Cette hypothèse ne peut être confirmée que si l'étude est complétée par l'analyse de ces différentes fractions dans le lactosérum de *Bouhezza*.

II.3.2. Composition en acides gras libre

L'étude de la fraction lipidique du *Bouhezza*, est en fait, une première initiation à la composition en acides gras libre du fromage d'expérimentation. En complémentarité à ce travail, BELBELDI (2013) a caractérisé la fraction lipidique du *Bouhezza* de ferme.

Les résultats obtenus par GC/MS sur quelques échantillons de *Bouhezza* de fabrications contrôlées, à 7j, 15j et 49j ainsi que du *Lben* sont illustrés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Composition en acides gras libre de la fraction lipidique du fromage *Bouhezza* d'expérimentation

Acides gras libres (%)	Temps de rétention (r)	<i>Lben</i>	<i>Bouhezza</i>		
			7j	15j	49j
Acide butyrique (C4:0)	8,63	0,64	0,64	0,55	0,81
Acide caproïque (C6:0)	14,2	0,94	0,92	0,77	0,99
Acide caprylique (C8:0)	20,58	3,82	3,60	3,20	3,78
Acide laurique (C12:0)	31,46	4,16	3,83	3,53	3,87
Acide myristique (C14:0)	36,09	14,92	13,72	13,53	14,19
Acide palmitique (C16:0)	40,27	35,25	33,50	34,30	33,91
Acide pentadecanoïque (C15:0)	38,21	1,65	1,51	1,38	1,48
Acide oméga -pentadecanolide (C15:0)	35,85	1,48	1,39	1,21	1,38
Acide palmitoléique, oméga 7	39,88	2,38	2,67	2,46	2,57
Acide margarique (C17:0)	41,48	2,14	1,95	1,88	1,81
Méthyl 9,10-méthylène hexadécanoate	41,78		0,38	0,36	0,35
Acide linoléique (C18:2)	43,54	1,82	2,07	2,03	2,25
Acide 13-Octadecénoïque (C18:1 cis-9)	43,65	16,95	20,93	21,92	20,59
Acide stéarique (C18:0)	44,04	12,75	11,74	12,03	11,13
acide linoélaïdique (C18:2) omega 6	44,40	0,64	0,91	0,91	0,90

(% de la somme des pics)

Ces résultats préliminaires montrent la présence de plusieurs acides gras libres (AGL) dans le fromage *Bouhezza* qui peuvent faire partie de sa fraction aromatique. Parmi les acides gras saturés, l'acide palmitique et l'acide stéarique sont les plus importants, d'autre part les acides gras mono-insaturés sont présentés par l'acide 13-Octadecenoïque poursuivi par les acides poly-insaturés l'acide linoléique et son acide gras isomère l'acide linoélaïdique.

Nous notons aussi la présence d'acides gras à nombre impaire d'atomes de carbone, l'acide pentadecanoïque (C15:0) et l'acide oméga -pentadecanolide (C15:0) et l'acide margarique (C17:0). Tous ces composés sont présents dans le *Lben* sauf pour le méthyl 9,10-méthylène hexadécanoate qui doit provenir du métabolisme des microorganismes.

En comparaison avec d'autres fromages, GOBETTI (2004) cite les acides butanoïque (C4:0), hexanoïque (C :6), tétradécanoïque (C14:0), hexadécanoïque (C :16) et octadécanoïque (C18:1) comme principaux constituants des acides gras libres des plusieurs fromages italiens à pâte extra-dure (le *Parmigiano Reggiano*, le *Pecorino Roman* le *Canestrato peglies* et le *Fossa*. Aussi, les acides gras C15:0 et C17 :0 ont été signalés dans le fromage Piedmont "Ossolano" par ZEPPA *et al.* (2003).

En complément avec nos résultats, le travail en collaboration réalisé par BELBELDI (2013) a montré que la concentration en acide linoléique de six échantillons *Bouhezza* de ferme est variable entre eux. Concernant le ratio d'acides gras polyinsaturés oméga6/oméga3, il était assez intéressant puisqu'il est en moyenne de 4,25. D'un point de vue nutritionnel, la consommation de 100 g de fromage *Bouhezza* contribuerait en moyenne à 3% de l'apport diététique recommandé en acide linoléique pour un homme adulte (MARIA MARINO *et al.*, 2012).

Parmi les acides linoléiques conjugués (ALC), l'acide ruménique (isomère cis-9, trans-11) était le plus abondant avec une proportion de plus de 80 %. Cet acide gras trans est aussi le plus important dans la plupart des fromages (WERNER *et al.*, 1992). L'effet de anticancérigène, antiathérosclérose et antidiabétique de ces ALC est confirmé chez les animaux (BAUMAN *et al.*, 2000 et BANNI *et al.*, 2001). Il faut rappeler que le fromage *Bouhezza* est fabriqué avec le *Lben* qui est presque totalement écrémé avec ajout d'une faible quantité de lait entier. Ceci induit une faible teneur en matière grasse et en ces différents acides.

Selon BELBELDI (2013), la présence d' α tocophérol et de β carotène a été aussi détectée dans la fraction lipidique du fromage *Bouhezza*. Une nette différence dans la teneur en β carotène a été soulevée entre les *bouhezza* épicés avec le piment rouge piquant et ceux non épicés. En effet, le piment rouge est assez riche en β carotène (OZGUR et al., 2011).

Conclusion partielle

Pour une meilleure caractérisation de la composition globale de *Bouhezza*, tous les fromages de ferme (22 échantillons) ont fait l'objet de comparaison physico-chimique avec les échantillons des six fabrications contrôlées de *Bouhezza* affinés jusqu'à 70 j. Cette comparaison a permis de dégager les conclusions suivantes :

- La teneur en extrait sec total (EST) du *Bouhezza* varie entre 23,5 et 35 g/100 g de fromage. Les fromages les plus jeunes ont les teneurs les plus faibles. De sa part, la teneur en Gras/Sec dans les deux groupes d'échantillons augmente avec la durée d'affinage du fait de l'ajout du lait entier. Les teneurs maximales enregistrées sont 35 et 39 % de Gras/Sec respectivement dans les fromages de ferme et d'expérimentation. Par ailleurs, la teneur en protéines dans la matière sèche varie entre les échantillons (43 à 56 %). Concernant les autres caractéristiques, les résultats montrent un fromage à caractère acide qu'il soit pour le fromage de ferme ou d'expérimentation avec un pH allant de 3 à 4, une acidité lactique de 1 à 2,5 g/100 g de fromage et une salinité légère estimée à 2,2 g/100 g. Le diagramme de fabrication adopté est confirmé en partie dans la comparaison des résultats sur l'ensemble de caractéristiques précitées (EST, MG/EST, pH acidité et teneur en chlorures). Suivant les indications de ces résultats, *Bouhezza* est un fromage à pâte molle et mi-gras affiné dans la masse.

- La protéolyse dans le fromage est plus significative à la première phase de fabrication avec une hydrolyse principale de la caséine α s. La lipolyse dans *Bouhezza* est caractérisée par la présence d'acides gras libres saturés à chaîne courte, moyenne et longue. Les acides palmitique et stéarique sont les plus importants. La présence d'acide gras mono-insaturé (ac. Palmitoléique et 13-Octadecénoïque), poly-insaturés (ac. linoléique et linoélaïdique) et à nombre impaire d'atomes de carbone a été aussi marqué. L'acide 13-Octadecénoïque est l'acide gras insaturé le plus important.

II.4. Etude du profil aromatique du fromage *Bouhezza*

Sachant que ce travail est une première approche des arômes du fromage traditionnel *Bouhezza*, nous avons opté à l'utilisation de l'ensemble des techniques à notre disposition pour pouvoir répondre à la question de la « composition du profil aromatique du fromage ». En premier, une vue globale des composées volatiles dans le *Bouhezza* de ferme est présentée par l'analyse de Smart Nose, ceci pour comparer les fromages de ferme à différentes périodes d'affinage entre eux (75 et 120j). Ensuite nous exposons les résultats de l'analyse par SPME/GC/MS de ces échantillons en comparaison avec les *Bouhezza* de la fabrication contrôlée. En dernier, l'analyse par GC/MS/ Olfactométrie nous donnera les principaux composées odorant actifs dans le fromage *Bouhezza* et leur évolution durant la fabrication de 70j.

II.4.1. Empreintes des composés aromatiques du *Bouhezza* par Smart Nose

L'analyse par SMart Nose a concerné quatre échantillons du fromage *Bouhezza* de ferme. Une analyse multidimensionnelle, l'Analyse en Composante Principales (ACP). Les résultats de l'ACP, montrent des variabilités dans le profil du *Bouhezza* de ferme. Les résultats du score plot sont donnés dans la figure 35

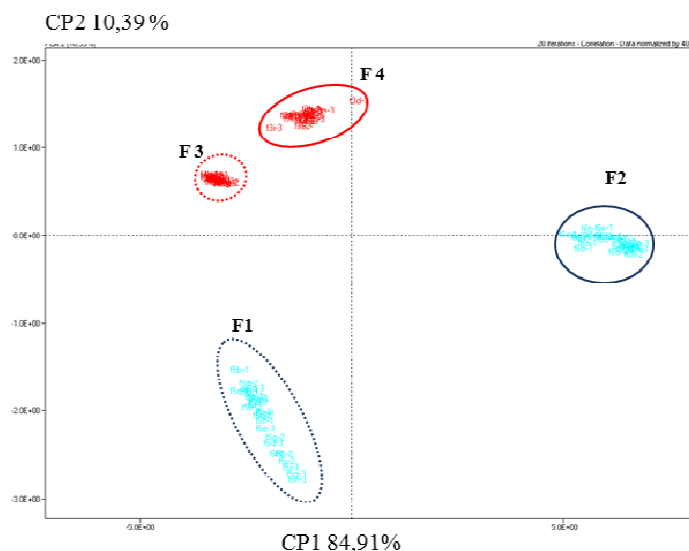


Figure 35. Carte de ressemblance par ACP des composés aromatiques du *Bouhezza* de ferme par SMart Nose (75j F1 et F2; 150j : F3 et F4)

Nous avons choisi de travailler avec les deux composantes principales ayant expliqué la variabilité la plus élevée qui se rapproche le plus à 1 (Kaiser le critère : MASSART *et al.*, 1988), soit dans notre cas 95,3 %, CP1 et CP2. La CP1 classe les

fromages en fonction de leurs origines et la CP2 les classes du plus hétérogène (bas de la carte) contre les plus homogènes. Nous avons noté que la CP1 était la plus déterminante et a expliqué 84,91 % de variabilité totale, tandis que la CP2 a expliqué 10,39 % de variabilité totale. La figure montre quelques différences entre les empreintes des composés volatiles de *Bouhezza* de ferme. Cette dissimilarité est due à la différence dans la composition du fromage et le savoir-faire des fermes dont principalement la préparation traditionnelle du *Lben*, de la *Chekoua* et du type de piment rouge ajouter lors de l'assaisonnement pour la consommation.

Tenant en compte la 2^{ème} CP (CP2), les fromages sont différents selon la durée d'affinage. Les fromages à 150j sont largement séparés des fromages à 75j. Aussi, une variabilité entre les deux *Bouhezza* F1 et F2 a été noté. Ces résultats montrent que marginalement (CP 10,39 %), la durée d'affinage influence la fraction aromatique du fromage *Bouhezza*. Les résultats illustrent que le profil aromatique du fromage peut être aussi affecté par différents facteurs. De ce fait, un nombre plus important d'échantillons s'oppose.

D'autre part la technique du « nez électronique » joue le rôle d'un capteur d'odeur, qui ne doit pas être confondus avec la chromatographie en phase gazeuse ou l'analyse sensorielle. Comme le système sensoriel humain, ces systèmes de détection d'odeur électronique intègrent des capteurs (qui sont conceptuellement semblables aux récepteurs olfactifs humains) et un système de traitement des données (qui sur le plan conceptuel simule le cerveau). Tout comme l'homme, qui ne peut identifier consciemment chaque constituant d'une odeur pour la reconnaître, le « nez électronique » exploite la configuration des composants d'odeur (MIELLE, 1996).

II.4.2. Profil aromatique du *Bouhezza* par SPME/GC/MS

L'analyse par SPME/GC/MS a été entreprise pour déterminer les composés organiques volatiles (COVs) du fromage de ferme. Aussi, elle permet de compléter les résultats de l'analyse de Smart Nose en identifiant les principaux COVs responsables de la variabilité entre les fromages qui ont la même durée d'affinage (F1 et F2, 75j).

Les résultats de la SPME/GC/MS ont permis d'identifier un nombre important de composés organiques volatiles. Le nombre retrouvé dans les différents fromages de ferme varie entre 33 et 35 COVs, en parallèle, les échantillons d'expérimentations C1 et C2 à 70j

d'affinage avaient respectivement 37 et 34 COVs. L'ensemble de ces composés appartiennent à huit classes chimiques différentes, comme illustré dans le tableau 18.

Tableau 18 Classes chimiques de composés organiques volatiles (COVs) identifiés dans le *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par SPME/GC/MS

Classe chimique	F1	F2	F3	F4	C1	C2
	75 j	75j	150 j	150 j	70 j	70 j
Acides	2	3	4	2	4	5
Alcools	6	3	4	7	4	2
Aldéhydes	2	1	2	2	3	2
Hydrocarbures	1	3			1	1
Esters	18	21	22	18	23	22
Cétones	1	1	1			
Terpènes	2	2	1	1	2	2
Ether	1	1				
Total	33	35	34	30	37	34

F1, F2, F3 et F4 échantillons de *Bouhezza* de 04 fermes différentes ; C1 et C2 fromage *Bouhezza* de fabrications contrôlées à 70j d'affinage.

Ce tableau indique que la classe chimique des esters est la plus importante vue le nombre important des COVs identifiés. Pour chacun des composés identifiés, une valeur de pic a été calculée pour détecter les principales différences dans le profil aromatique des échantillons de *Bouhezza*.

II.4.2.1. Classe des esters

Le tableau 19 donne les composés chimiques retrouvés dans la classe des esters du fromage *Bouhezza* de ferme. Dans cette classe six composés semble être les plus importants, se sont le 1-butanol, le 3 méthyle acétate, le n-propyl acétate, le 2-phenylethyl acétate, le propyl propanoate et le propyl butanoate. Aussi, treize esters ont été communs entre tous les échantillons de ferme où le 1-butanol et le 3 méthyle acétate ont marqués les pics les plus importants dans le fromage F1. Deux esters : le 2-phenylethyl acétate et le propyl butanoate ont été présent dans 75% des échantillons.

Tableau 19 : Composés volatils (valeur de la zone x 10⁶) identifiés par SPME / GC / MS dans le *Bouhezza* de ferme : Esters

Composés organiques volatils (COVs)	RT ^{ab}	F1	F2	F3	F4
		75 j		150 j	
<i>Esters</i>					
Ethyl acetate	3,23	1,56	0,00	0,00	0,00
Ethyl butanoate	5,7	3,13	9,27	1,49	3,70
Ethyl hexanoate*	11,34	10,19	50,93	13,08	14,18
Ethyl heptanoate	13,99	0,00	0,00	0,00	0,75
Ethyl octanoate*	16,52	11,28	36,95	12,87	7,07
Ethyl nonanoate	18,87	0,43	0,83	0,51	0,39
Ethyl 9-decanoate	20,92	0,00	4,11	0,00	0,00
Ethyl decanoate*	21,10	9,43	25,58	7,24	3,08
Ethyl dodecanoate	25,21	1,34	5,36	1,00	0,53
Ethyl tetradecanoate	28,91	0,00	2,19	0,43	0,00
Ethyl hexadecanoate	31,73	0,00	2,09	0,00	0,00
N-propyl acetate**	3,71	1,13	29,94	97,15	14,89
Propyl propanoate**	5,95	0,00	0,00	72,64	0,00
Propyl butanoate*	8,45	0,00	80,89	6,26	19,08
Propyl hexanoate*	13,93	0,49	36,87	6,48	1,58
Propyl octanoate*	18,78	0,65	25,96	3,78	1,73
Propyl decanoate*	23,12	0,78	13,22	1,92	0,73
Isopentyl hexanoate	17,83	0,44	1,12	0,47	0,16
Hexyl acetate	11,70	0,52	0,00	0,40	0,81
2-methyl-propyl acetate	5,03	9,99	0,87	0,00	0,00
2-methyl-3-methyl-butyl propanoate	12,91	1,15	0,00	2,08	0,00
3-methyl-butyl butanoate	12,90	0,00	0,00	2,11	1,22
1-butanol, 3-methyl acetate*	7,87	220,02	62,70	21,73	20,79
1-butanol, 3-methyl propanoate	10,51	0,00	0,00	2,51	0,00
2-phenylethyl acetate*	17,89	75,15	24,95	12,91	9,67
2-phenylethyl propanoate	20,10	0,00	4,91	3,64	1,60
2-6-octadien-1-ol, 3-7-dimethyl acetate	20,71	0,00	1,03	0,00	0,00

^a RT: Temps de rétention. * composé avec la plus grande variabilité dans les fromages à 75j d'affinage; ** : composé avec la plus grande variabilité dans les fromages à 150j d'affinage;

Les esters, qui sont responsables des saveurs fruitées dans les produits laitiers fermentés sont générés par deux mécanismes enzymatiques : l'estérification et l'alcoololyse (LIU *et al.*, 2004). Comme décrit par certains auteurs, les esters d'acide butyrique et

d'acide hexanoïque sentent des odeurs de pommes et d'orange, respectivement, et ont été détectés dans différents fromages affinés au lait de vache et de brebis (CARPINO *et al.*, 2004; HORNE *et al.*, 2005). La classe chimique des esters a été aussi responsable des notes fleurales dans les fromages (HORNE *et al.*, 2005). En comparaison avec d'autres fromages en peaux de chèvre, 9 esters ont été retrouvés dans le fromage Tulum (éthyle acétate, éthyle butanoate, éthyle hexanoate, éthyle octanoate, éthyle decanoate, n-propyl acetate, propyl hexanoate, 2-methyl-propyl acétate and 3-methyl-butyl butanoate) (HAYALOGLU *et al.*, 2007 a, b).

II.4.2.2. Classe des alcools, acides et aldéhydes

Le profil aromatique des acides, alcools et aldéhydes du fromage *Bouhezza* de ferme est donné dans le tableau 20.

Tableau 20 : Composés volatils (valeur de la zone x 10⁶) identifiés par SPME/GC/MS dans le *Bouhezza* de ferme : acides, alcools et aldéhydes.

Composés organiques volatils (COVs)	RT ^{ab}	F1	F2	F3	F4
		75 j		150 j	
<i>Acides</i>					
Acide 2-Methyl, butanoïque	7,51	0,00	0,00	1,78	0,00
Acide 3-Methyl, butanoïque	7,30	0,00	0,00	16,82	0,00
Acide Hexanoïque *	10,82	4,11	17,55	4,32	2,52
Acide Octanoïque *	15,89	3,78	15,08	2,08	0,73
Acide n-Decanoïque	20,35	0,00	0,86	0,00	0,00
<i>Alcools</i>					
3-Methyl,1-butanol	4,12	64,33	0,00	0,00	55,60
1-Heptanol	10,51	0,00	0,00	0,00	3,57
2-Heptanol	8,53	8,31	0,00	0,00	19,73
1-Octanol	13,29	6,56	4,51	2,56	5,62
1-Nonanol	15,90	3,78	0,00	2,08	3,17
2-Nonanol	14,13	3,01	0,00	1,35	4,48
Phenylethyl alcohol**	14,44	18,25	8,03	43,31	9,77
<i>Aldéhydes</i>					
Nonanal	14,19	1,85	2,83	1,83	3,59
Decanal	16,75	1,52	0,00	1,62	2,14

^a RT: Temps de retention. * composé avec la plus grande variabilité dans les fromages à 75j d'affinage; ** : composé avec la plus grande variabilité dans les fromages à 150j d'affinage;

Dans les fromages de fermes, 5 acides gras libres ont été identifiés par la SPME/GC/MS. Les acides gras les plus importants avec les pics les plus représentatifs, en

ordre décroissant sont : l'acide hexanoïque, l'acide 3-méthyl butanoïque et l'acide octanoïque. Ces mêmes composés ont été signalés dans le fromage Tulum (HAYALOGLU *et al.*, 2007 b) et le fromage Queso Ibores (DELGADO *et al.*, 2011). Les acides butanoïque et hexanoïque ont été présents dans tous les échantillons de *Bouhezza*. Des études sur le fromage affiné, le Ragusano au lait de vache, le fromage Piacentunu Ennese au lait de brebis et sur des fromages espagnols au lait de chèvre ont décrit les acides gras butanoïque et hexanoïques liés à des saveurs de rance/chaussette sale et de sueur respectivement (CARPINO *et al.*, 2004;.. HORNE *et al.*, 2005;.. POVEDA *et al.*, 2008). Selon la bibliographie, les acides gras libres sont originaires de différentes réactions métaboliques des bactéries lactiques impliquant la dégradation des lipides, des protéines et de la fermentation alcoolique (CURIONI *et al.*, 2002) et de l'oxydation des aldéhydes (SMIT *et al.*, 2005). Les réactions de lipolyses contribuent directement à la production d'acides gras libres (Mc SWEENEY and SOUSA, 2000). Ces composés ont des propriétés aromatiques notées dans un grand nombre de fromages (DELGADO *et al.*, 2011; POVEDA *et al.*, 2008).

Le tableau 20 indique qu'au sein des alcools détectés trois présentent les pics les plus importants, ce sont : le 3-méthyl, 1-butanol, le phényléthyl alcool et le 2-heptanol. Ces composés ont été aussi retrouvés dans le Tulum (HAYALOGLU *et al.*, 2007 b). D'après PANSERI *et al.* (2008) ces composés donnent aux fromages une marque de vert et d'huile. D'autre part, le 1, octanol et le phényléthyl alcool sont communs dans tous les *Bouhezza* de ferme et aussi aperçu dans le fromage Darfiyeh (SERHAN *et al.*, 2010) ainsi que dans le lait cru de vache (RAPISARDA *et al.*, 2013). Le profil des composés alcooliques dans le fromage *Bouhezza* est probablement le résultat de l'addition du lait cru en fin de maturation. L'ajout de ce lait affecte la synthèse des composés volatils alcooliques. Lors de l'affinage des fromages, les alcools sont générés par les microorganismes à partir du lactose et des acides aminés (MOLIMARD et SPINLER 1996).

Entre les autres constituants des composés organiques volatils du fromage *Bouhezza*, sont présents 2 aldéhydes, 2 cétones et 2 terpènes. Le nonanal est l'aldéhyde le plus commun entre les différents fromages de ferme (Tab. 20), cependant le décanal a été retrouvé dans 75% des échantillons. Selon CARPINO *et al.* (2010), le nonanal est lié à la saveur du lait frais dans le produit laitier italien Trachanas, par ailleurs, et selon RAPISARDA *et al.*, (2013), le décanale sent une odeur floral/noix dans le lait cru. Dans les fromages affinés, les aldéhydes résultent de la décarboxylation des acides gras ou de la

désamination des acides aminés (DUNN et LINDSAY, 1985). Nous avons noté une faible présence des aldéhydes dans le profil aromatique du fromage *Bouhezza*, ceci peut être dû à la transformation rapide de ces derniers en alcools ou en acides, comme soulevé dans le cas du Cheddar par DUNN et LINDSAY (1985).

II.4.2.3. Classe des cétones, terpènes et autres

Les deux cétones retrouvés dans le fromage *Bouhezza* de ferme sont le 2 nonanone (dans F1 et F3) et le 2 tridécanone (dans seulement F2) (Tab. 21). La présence du 2 nonanone a été signalée dans d'autres fromages affinés comme le Cheddar, le Tulum et les fromages espagnols au lait de chèvre (URBACH, 1993 ; HAYALOGLU *et al.*, 2007 b; DELGADO *et al.*, 2011).

Tableau 21 : Composés volatils (valeur de la zone x 10⁶) identifiés par SPME/GC/MS dans le *Bouhezza* de ferme : cétones et autres.

Composés organiques volatils (COVs)	RT ^{ab}	F1	F2	F3	F4
		75 j		150 j	
<i>Cétones</i>					
2-Nonanone	13,81	0,35	0,00	1,51	0,00
2-Tridécanone	23,21	0,00	0,79	0,00	0,00
<i>Terpènes</i>					
α -Pinene	9,40	0,87	1,33	0,00	0,00
d-Limonene*	12,14	2,60	122,05	2,12	1,72
<i>Autres</i>					
1,4-Cyclohexadien-1-méthyl-4,1-méthylethyl**	12,93	0,00	0,00	0,00	10,19
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-diméthyl **	14,06	0,00	0,00	2,40	29,34
Trans-cyclohexanone, 2-méthyl-5-(1-méthylethényl)**	17,69	0,00	0,00	0,00	92,77
Cyclohexane, 1,2-méthyl, 5-méthyl ether **	16,56	0,00	0,00	1,20	12,47

^a RT: Temps de rétention, * composé avec la plus grande variabilité dans les fromages à 75j d'affinage; ** : composé avec la plus grande variabilité dans les fromages à 150j d'affinage;

Le plus important composé terpénique retrouvé dans le *Bouhezza* de ferme est le d. Limonène avec la valeur la plus importante dans le fromage F2. Ce composé est commun entre tous les fromages de ferme et aussi d'expérimentations. L' α -Pinene a été présent seulement dans les fromages à 75j d'affinage. BELITZ et GRASH (1986) rapportent que les terpènes ont une origine végétale et ils ne sont pas un produit du métabolisme des microorganismes. Ils peuvent aussi être apportés par le lait, selon l'alimentation du bétail, affectant ainsi la flaveur des arômes (BUGAUD *et al.*, 2001). La présence des terpènes

dans le *Bouhezza* peut être liée à l'alimentation de bétail ou à l'ajout du piment rouge piquant dans le fromage. Une autre source des terpènes est le genièvre utilisé dans la préparation de la *Chekoua* ou même saupoudré à sa surface durant la fabrication de *Bouhezza*. Selon MAZARI *et al.* (2010), les huiles essentielles du genièvre sont caractérisés par l' α terpène et le limonène.

Le tableau 21 compte la liste du reste des composés volatiles retrouvés dans le fromage *Bouhezza* de ferme. La présence de ces composés est aléatoire d'un échantillon à un autre. Le 1,4-Cyclohexadien-1-méthyl-4,1-méthylethyl et le Trans-cyclohexanone, 2-méthyl-5-(1-méthylethenyl) ont été retrouvés seulement dans le *Bouhezza* F4. Alors que, le 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-diméthyl et le Cyclohexane, 1,2-méthyl, 5-méthyl éther ont été retrouvés dans F3 et F4.

En se référant à l'ensemble de ces résultats (Tab. T9, 20 et 21), la fraction aromatique du fromage *Bouhezza* de ferme est très riches composés volatiles appartenant à différentes classes chimiques. La classe chimique dominante est celle des esters. La comparaison des fromages des quatre fermes présentaient selon l'analyse de Smart Nose une certaine différence qui a été identifiée par l'analyse de SPME/GC/MS. En complément avec les tableaux précités, la figure 36 indique que la plus grande variabilité montrée dans F1 et F2 pourrait s'expliquer par la valeur de pics de certains esters, acides gras libres et terpènes (Fig. 36).

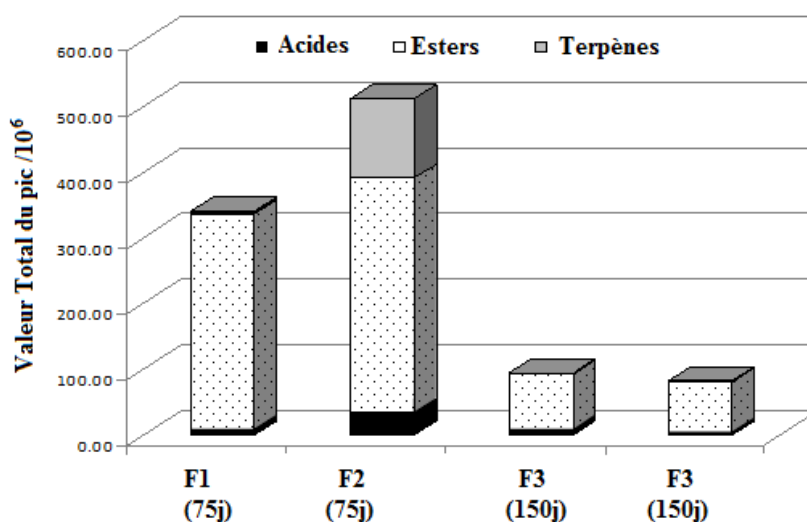


Figure 36 : Composés organiques volatiles responsables de la plus grande variabilité dans le *Bouhezza* de ferme

II.4.2.4. Comparaison du profil aromatique de *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par SPME/GC/MS

Le tableau suivant (Tab. 22) regroupe l'ensemble des composés aromatiques retrouvés dans les fromages de ferme et d'expérimentations.

Tableau 22: Composés aromatiques communs entre le fromage *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par SPME/GC/MS.

Composés organiques volatiles	Classes chimiques
Acide butanoïque ethyl ester	Ester
n propyl acetate	Ester
1 butanol 3-methyl acetate	Ester
Acide butanoïque propyl ester	Ester
Acide hexanoïque ethyl ester	Ester
Acide hexanoïque propyl ester	Ester
Acide octanoïque ethyl ester	Ester
Acide acétique 2 phenyl ethyl ester	Ester
Acide nonanoïque ethyl ester	Ester
Acide decanoïque ethyl ester	Ester
Acide decanoïque propyl ester	Ester
isopentyl hexanoate	Ester
acide hexanoïque	Acide
Acide octanoïque	Acide
2 nonanol	Alcool
phenyl ethyl alcool	Alcool
Nonanal	Aldéhyde
propyl octanoate	Aldéhyde
D Limonen	Terpène
Total	19

Dix-neuf composés volatiles, identifiés par SPME/GC/MS, ont été communs dans le profil aromatique du *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation. Ces composés appartiennent à 9 classes chimiques (esters, acides, alcools aldéhydes et terpènes). L'ensemble de ces composés fait partie intégrante de l'arôme de *Bouhezza* qui évolue du *Lben*, matière première, au fromage affiné. Selon SAMET *et al.* (2010) les arômes du *Lben*

sont caractérisés par 04 composés seulement : l'acétaldéhyde, l'éthanol, le diacétyle et l'acétoïne. L'apparition du reste de composés est le résultat des modifications induites par la flore indigène du fromage. Le groupe de composés organiques volatiles le plus dominant est celui des esters avec 12 COVs/19 COVs. Ceci suggère la présence dans la masse du fromage d'un bon nombre d'acides gras libres et d'alcools couplés à des mécanismes enzymatiques appropriés qui permettent la synthèse de ces composés. FENSTER *et al.* (2003) ont démontré que les estérases de LAB, spécialement de *Lb. Helveticus*, *Lb. casei* et *Lactococcus lactis*, sont capables de synthétiser des esters éthyliques et que cette synthèse est influencée par les types d'enzymes, l'aw, et les types d'AG disponibles comme co-substrats.

II.4.3. Profil aromatique du *Bouhezza* par HS/GC/MS et Olfactométrie

Le profil aromatique des fromages de fermes analysés par la GC/MS et l'Olfactometrie a lui aussi montré que la classe des esters est la plus importante. Le tableau 23 donne l'ensemble des classes chimiques retrouvées dans les deux groupes de fromage montrant l'importance des esters dans la composition de l'arôme du fromage.

Tableau 23 : Comparaison entre le *Bouhezza* de ferme et d'expérimentation par GC/MS/O

Classe chimique	L1	L2	F1	F2	F3	F4
	70 d	70 d	75 d	75 d	150 d	150 d
Acides	2	2		1		
Alcools	2	2	2	1	1	1
Aldéhydes	4	4	5	3	6	6
Hydrocarbones	1					
Esters	8	7	6	3	5	3
Cétones	3	2	2	2	2	2
Purizine	0	0	1	1	1	1
Pyridine				1		
Sulfures	2	1	1	1	2	1
Terpènes	1	1	2	0	1	1
Total	23	19	19	13	18	15

En complément, les arograms des fromages de ferme donnés en figure 37 dévoilent la présence de plusieurs odeurs dans le *Bouhezza*.

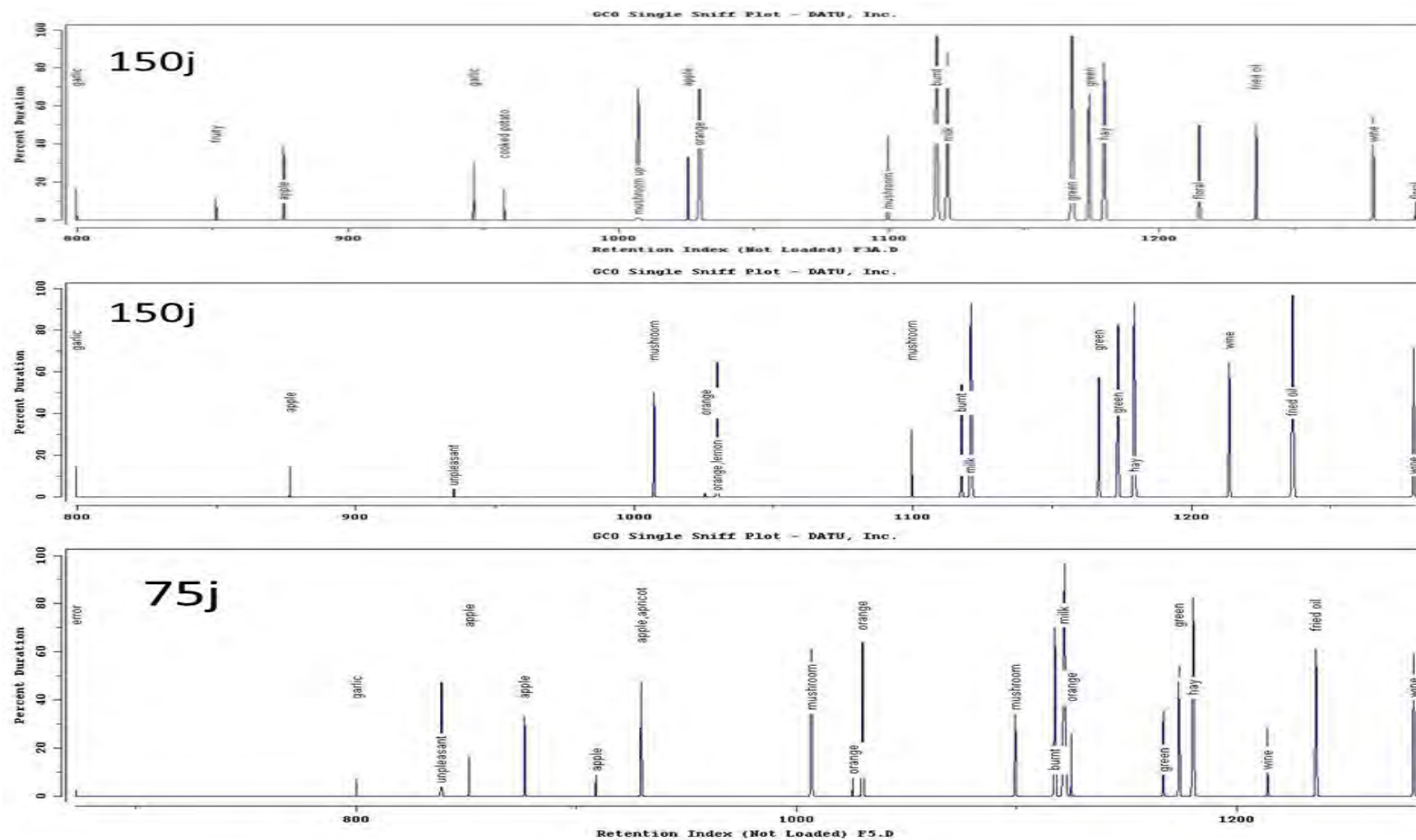


Figure 37 : Arograph des *Bouhezza* de ferme à 75j et 120 j d'affinage

La figure révèle que plusieurs odeurs composent l'arôme du fromage *Bouhezza*. Le nombre total des composés odorants actifs (COAs) sentit dans le *Bouhezza* de ferme est entre 18 et 19 COAs (Annexe VII) et dans le *Bouhezza* d'expérimentation affiné à 70j est de 18 COAs (Fig. 38). Les odeurs les plus importantes sont : odeur d'ail, pomme, butyrique, pomme de terre cuite, champignons, orange / citron, brûlé, lait, floral, rance, vert, foins, poivron rouge et huile de friture. Ceci montre que l'arôme de *Bouhezza* est très riche en composés odorants actifs.

II.4.3.2. Evolution des composés odorants actifs dans le *Bouhezza* d'expérimentations par HS/GC/MS et olfactométrie

Cette partie de la caractérisation, vise la description de l'évolution des composés odorants actives dans le fromage *Bouhezza*, et ceci sur une période de 70j. Des échantillons des deux fabrications contrôlées soit à 7j, 14j, 21j, 42, 56 et 70j ont été qualitativement analysés par HS/GC/MS et Olfactométrie.

Le nombre total des composés odorants actifs (COAs) du fromage *Bouhezza* durant les 70j de fabrication-affinage évolue entre 26 et 18 COAs entre 7 et 70j respectivement (Fig. 38). Ceci rejoint les résultats sur les fromages de ferme où le nombre COAs est entre 18 et 19.

En parallèle, le profil aromatique du *Bouhezza* de la fabrication contrôlée a été caractérisé par les esters (12 COAs), les aldéhydes (9 COAs) et les cétones (5 COAs). Nous avons noté que le *Bouhezza* le moins affiné comporte le nombre de COAs le plus important soit 26 composés par contre le fromage le plus affiné dispose du nombre le plus faible soit 18 COAs. Inversement, le fromage le affiné a le profil aromatique le plus riche. La comparaison des « arogrammes » donnée par la GC/MS/O en figure 38 montre les principales différences entre ces deux échantillons, selon le nombre de COAs et aussi l'importance des pics de chacun d'entre eux. La figure 38 illustre les COAs avec les valeurs de perception les plus importantes. D'autre part, les odeurs butyrique et épicé ont été senties dans seulement le *Bouhezza* à 70j. Le nombre plus élevé des COAs du fromage à 7j de fabrication reflète en effet une image de l'ensemble des odeurs du *Lben* et de la *Chekoua* de *Bouhezza* fraîchement préparée. Durant les différentes semaines de fabrication, la flore endogène du fromage continu à générer des composés d'arômes qui s'affinent au cours du temps et donnent au fromage ses propres caractéristiques organoleptiques.

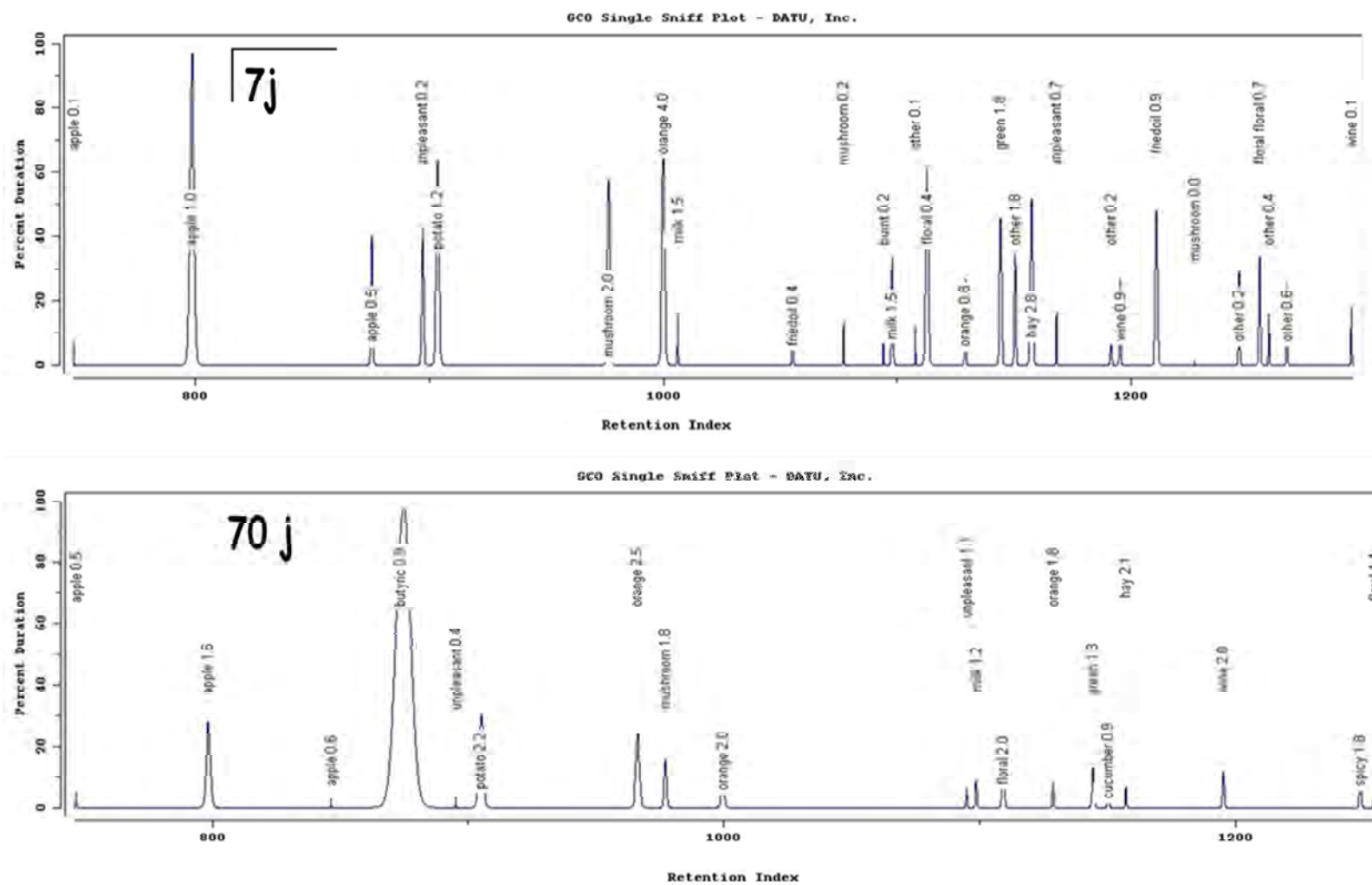


Figure 38 : Arograph des *Bouhezza* d'expérimentation à 7j et 70 j d'affinage

La confrontation des résultats de la GC/MS et de la GC/MS/O sur le *Bouhezza* permet de regrouper 10 COAs communs entre l'ensemble des fromages. Ces composés sont : 7 esters (ethyl butanoate, propyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl heptanoate, ethyl octanoate, 2-phenylethyl acetate, ethyl nonanoate), 1 acide (octanoic acid), 1 alcool (3-methyl, 1-butanol) et de 1 cétone (2-nonanone). Comme déjà noté, les esters donnent au fromage une note fruité, bière et de friture ; les acide une note de rance ; l'alcool la note de pommes et les acétones la note lactiques.

Conclusion partielle

Cette partie d'étude est une première approche scientifique sur le profil aromatique du fromage *Bouhezza*. Nous avons essayé de donner une idée globale sur les empreintes des composés volatiles du fromage *Bouhezza* par l'analyse de Smart Nose afin de déceler la présence de différence entre les échantillons et aussi de compléter cette analyse par l'étude du profil aromatique des mêmes échantillons par la technique de SPME/GC/MS.

Les résultats de la Smart Nose du *Bouhezza* de ferme montre que la fraction aromatique du fromage dépend à la fois de la durée d'affinage et du savoir-faire des familles, principalement le type de piment ajouté lors de la consommation (piment rouge piquant ou *Hrissa* épicé). La différence entre les fromages de ferme peut être expliquée par la différence des pics de quelques esters, acides gras libre et terpènes. En complément, la GC/MS/O a donné les principaux composés odorants actifs dans le fromage *Bouhezza*. La GC/MS et la GC/MS/O ont permis de définir des composés odorants clés dans le profil aromatique du fromage *Bouhezza*.

D'autres analyses quantitatives et qualitatives basé sur la GC/MS et aussi l'Olfactométrie sont nécessaires sur un nombre plus important d'échantillon pour donner le profil final du fromage. Certaines précautions sont à prendre en considération lors de la collecte des échantillons, comme la durée d'affinage, l'assaisonnement ou non et le type de piment.

II.5. Texture et microstructure du fromage *Bouhezza* d'expérimentation

II.5.1. Propriétés texturales et rhéologiques du fromage *Bouhezza*

II.5.1.1. Evolution de la fermeté et de la texture du *Bouhezza*

Un changement de la fermeté et de la texture du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication a été confirmé par le test du pénétromètre et du texturomètre (Fig. 39 et 40). Le tracé du test de pénétration représenté en figure 39 reflète une nette augmentation de la fermeté du fromage durant les 70j fabrication où nous passons d'un *Lben* (semi-liquide) à un fromage (solide).

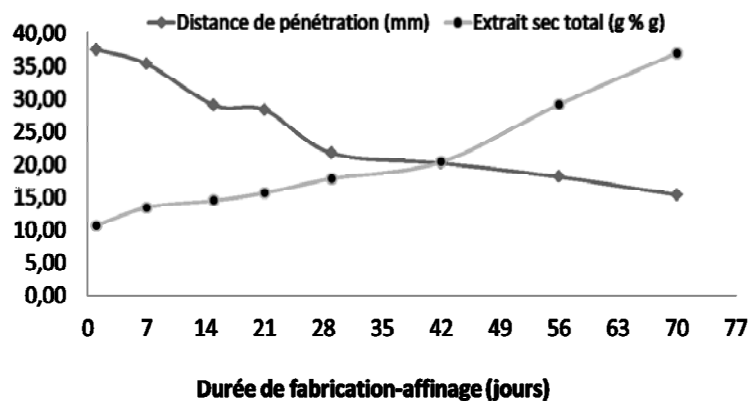


Figure 39 : Changement de la fermeté du *Bouhezza* durant la fabrication par pénétrometrie

La distance de pénétration à l'intérieure de la pâte passe de 35,3 mm à 15,36 mm entre 7 et 70 jours. Ceci indique un changement de la consistance du fromage *Bouhezza* liée avec l'augmentation de son extrait sec total.

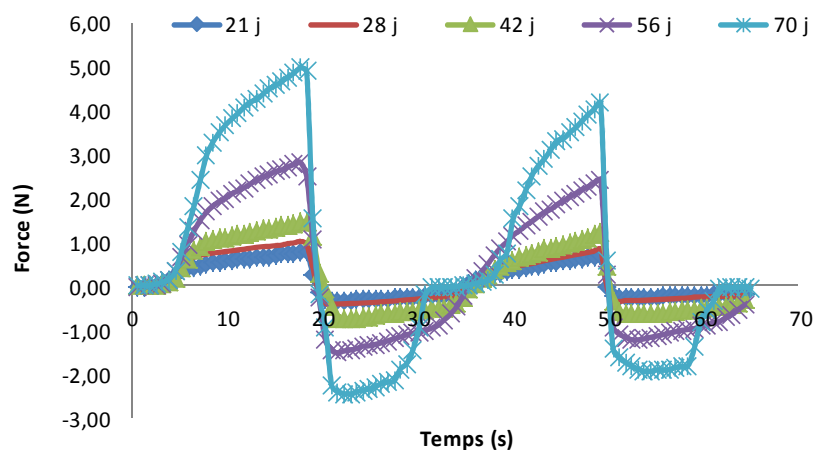


Figure 40 : Evolution du profil de la texture dans *Bouhezza* durant l'affinage (de 21j à 70j)

Cette augmentation de la fermeté est confirmée aussi avec l'analyse du profil de la texture. Les courbes représentées en figure 40 schématisent l'évolution de la texture du *Bouhezza* durant la fabrication-affinage de 70j. Nous marquons un changement progressif de la texture du fromage.

Les changements observés dans les principales propriétés texturales du fromage : sa dureté, sa cohésion et sa masticabilité entre les différentes périodes d'affinage sont donnés dans le tableau 24.

Tableau 24 : Changement du profil textural du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication-affinage

	Stade de fabrication-affinage (jours)							
	21j		30j		56j		70j	
Dureté 1 (N)	3,51	± 1,14	10,29	± 3,62	3,08	± 0,30	5,26	± 0,52
Dureté 2 (N)	2,87	± 0,97	8,80	± 3,06	2,47	± 0,26	4,28	± 0,38
Cohésion	0,59	± 0,10	0,61	± 0,06	0,67	± 0,02	0,61	± 0,06
Elasticité (mm)	9,07	± 0,30	9,50	± 0,45	9,15	± 0,38	9,10	± 0,43
Adhésion (N)	2,11	± 0,94	5,95	± 1,70	2,06	± 0,21	3,21	± 0,26
Masticabilité (Nmm)	19,33	± 9,02	56,99	± 18,56	18,80	± 1,92	29,11	± 1,92

Le profil textural de 21 à 70 j montre une légère augmentation de la dureté suivi par une nette évolution après ajout du lait cru avec une force maximale de 4,85 N à 70 j. Par ailleurs, l'adhésivité de la pâte atteint son maximum avant 42j, puis elle chute et se stabilise jusqu'à 70j. Deux caractéristiques semblent peu variées entre les différents échantillons, il s'agit de la cohésion et de l'élasticité.

II.5.1.2. Courbes d'écoulement

La corrélation entre le gradient de cisaillement (γ) et la contrainte (τ) définit la courbe d'écoulement. La détermination de la courbe d'écoulement et celle de viscosité permet de connaître le type du gel du fromage *Bouhezza*. La courbe d'écoulement du *Lben*

(Fig. 41), matière première du fromage *Bouhezza*, montre un corps viscolastique qui réponds à l'équation de CASSON : $\tau = \tau_c + K \dot{\epsilon}^n$.

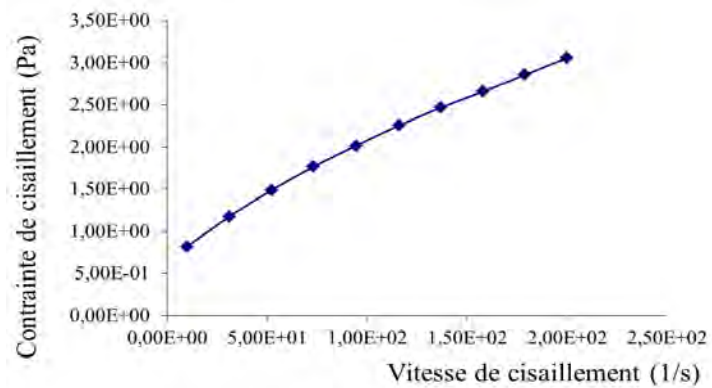


Figure 41 : Courbes d'écoulement du *Lben* de fabrication

Ensuite et durant la fabrication-affinage entre 21 et 70 j, l'indice de consistance de la pâte subit un changement important suite à l'ajout du lait cru sans pour autant de changer le comportement rhéologique du fromage.

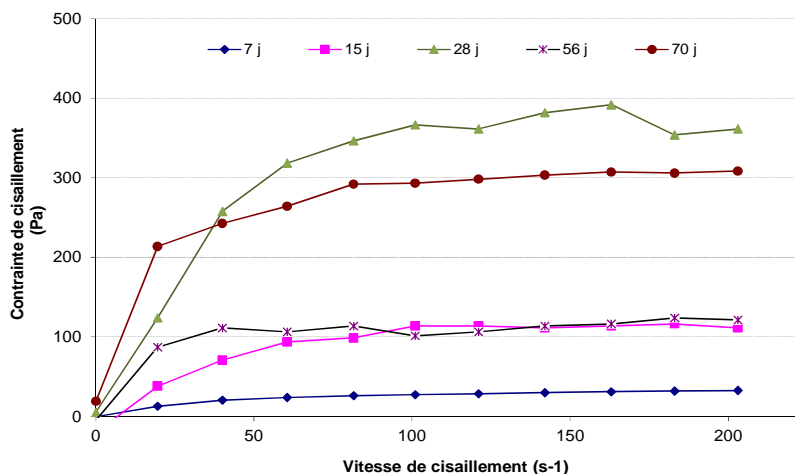


Figure 42 : Evolution des courbes d'écoulement du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication-affinage (70 j)

Le caillé qui prend forme à l'intérieure de la peau de chèvre révèle un comportement rhéofluidifiant de type Ostwald de Wael, répondant à l'équation : $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$ (caractère pseudo-plastique). Les courbes tracées entre 0j et 15j montrent un comportement newtonien (Courbes plates) caractérisant un gel liquide au début de la fabrication. A partir de 21j les courbes de viscosité du fromage *Bouhezza* à différents stades de fabrication montrent un comportement non newtonien de type rhéo-fluidifiant à caractère

pseudoplastique. Le modèle rhéologique qui caractérise ces écoulements est de type Ostwald de Waels dont l'équation est de $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$; où k est l'indice de consistance, et n l'indice de comportement de l'écoulement. Le changement dans les paramètres de chaque écoulement en fonction de l'âge du fromage est schématisé en figure 43. Ce modèle a été signalé dans le cas du produit laitier concentré par filtration ou par ultrafiltration le Lebneh (RAMI *et al.*, 2002).

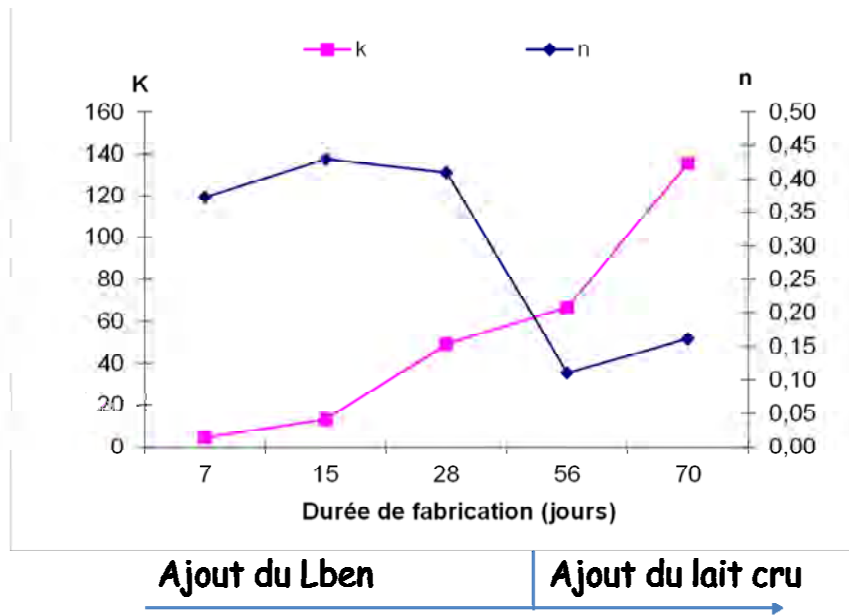


Figure 43 : Changement des paramètres d'écoulement en fonction de l'âge du *Bouhezza* (K et N)

Entre trois et six semaines de fabrication, l'indice de consistance de la pâte de *Bouhezza* reste stable puis subit un changement important suite à l'ajout du lait cru sans pour autant de changer le comportement rhéologique du fromage (caractère pseudo-plastique).

Les gels étudiés montrent un caractère viscoélastique rhéo-fluidifiant caractéristique des gels alimentaires en général. Les fluides rhéofluidifiant sont caractérisés par la diminution de la viscosité lorsque la vitesse de cisaillement augmente (COUARRAZE et GROSSIORD, 1991). Ce phénomène est expliqué par le fait qu'au repos ces gels présentent un ordre interne caractérisé par la présence d'un certain type et de nombre d'interaction (principalement hydrophobes et hydrogènes) qui maintient la structure tridimensionnelle du réseau gélifié et donc une viscosité élevée. Durant

l'augmentation du gradient de vitesse, les interactions sont rompues, les réseaux détruits et par conséquent la viscosité diminue (ROHM et JATROS, 2002 ; SCHER, 2006).

II.5.1.4. Evolution de la viscosité

L'évolution de la viscosité des pâtes fromagères (C1 et C2); au cours de la fabrication est présenté dans la figure 44.

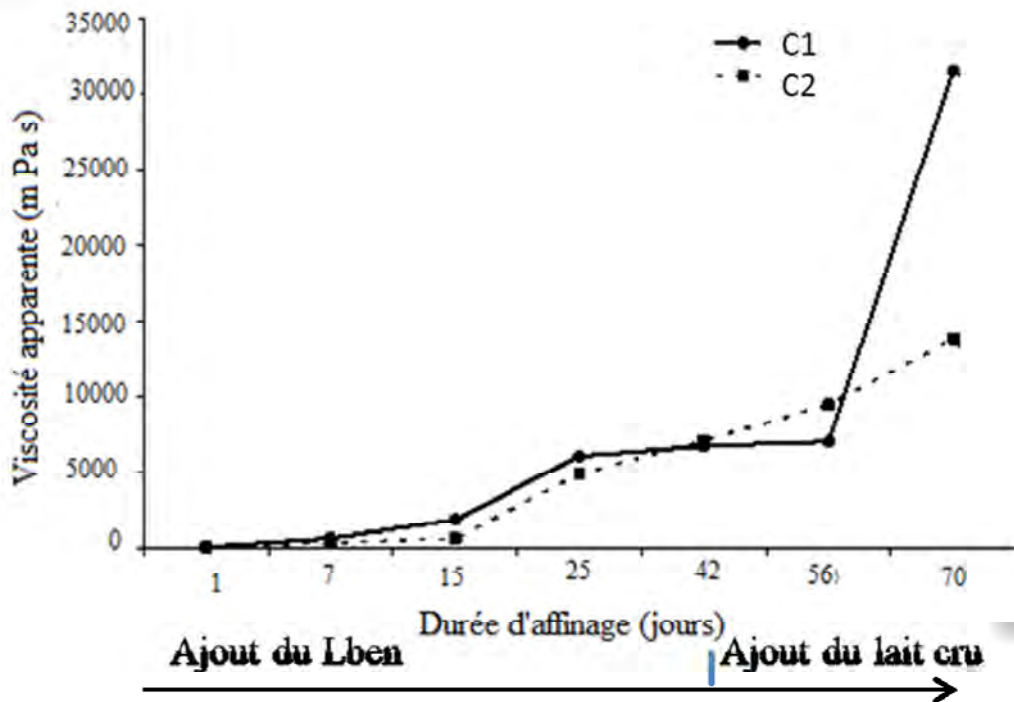


Figure 44: Evolution de la viscosité dans le fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication

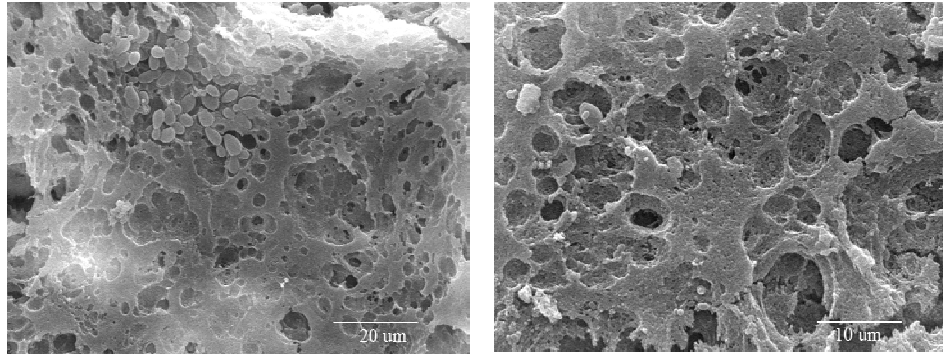
Cette figure complète les résultats précédents et montre une augmentation de la viscosité dans la pâte du fromage qui se forme au cours de la fabrication-maturation (70 jours). A la fin de l'affinage, la viscosité du fromage atteint son maximum. Vu l'aspect particulier du mode de fabrication du fromage *Bouhezza*, sa comparaison avec d'autres fromages semble difficile. Plus d'échantillons sur des fromages de fermes sont nécessaires.

II.5.2. Microstructure du fromage *Bouhezza*

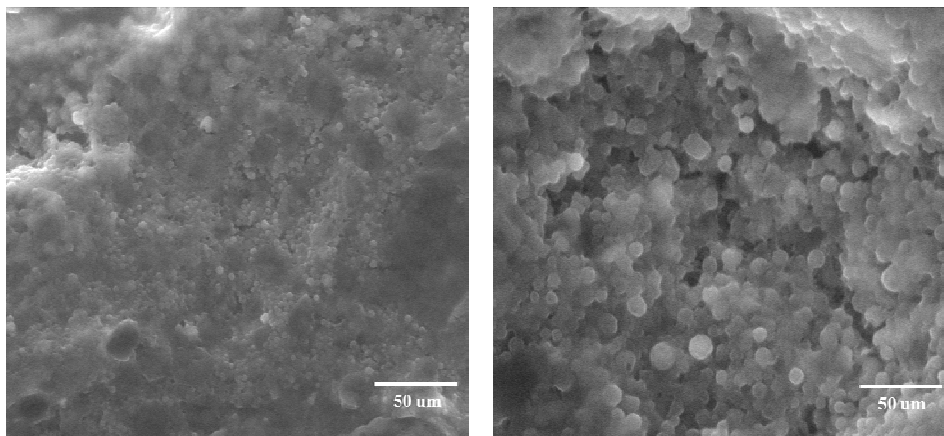
II.5.2.1. Microstructure du *Lben*

La microstructure du lait cru à pH 6,7, est un réseau protéique granuleux constitué par les micelles de caséines. Cependant, la structure microscopique du *Lben* artisanal, illustrée en figure 45, montre un réseau protéique dense avec quelques ouvertures. Les globules de matière grasse laissent une empreinte dans la microstructure du *Lben*. La

structure du *Lben* semble être constituée d'agrégats irréguliers laissant des ouvertures de différents diamètres et de taille variable. Ils étaient probablement des caséines totalement déminéralisée groupées en touffes (ATTIA *et al.*, 1991).



Microscope électronique balayage (MEB)



Microscope électronique à balayage environnementale (MEBE)

Figure 45 : Observation microscopique au MEB et MEBE du *Lben*

II.5.2.2. Microstructure du fromage *Bouhezza*

L'observation au MEB, montre une structure plus au moins compacte de la matrice protéique, creusée peu par les trous de la matière grasse (Fig. 46). Dans la masse protéique nous observons les limites des micelles où les caséines ne sont pas complètement fusionnées entre elles. Au cours de la fabrication le fromage s'enrichit en protéines et sa structure devient plus dense, ceci est marqué entre la première et la troisième semaine (figure 46 A et B) où l'aspect du fromage qui se forme change complètement.

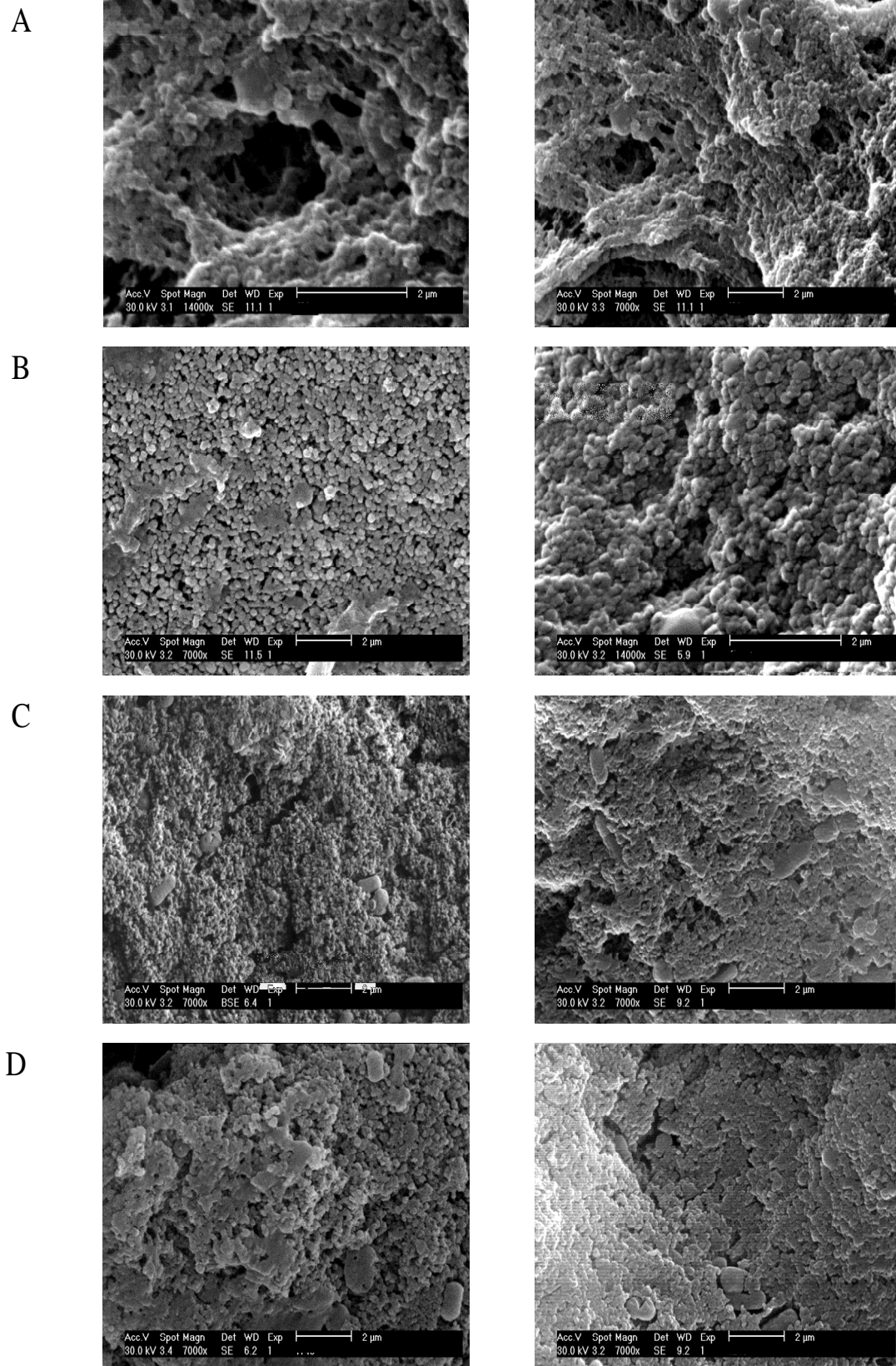


Figure 46 : Observation au microscope électronique à balayage du fromage *Bouhezza* au cours de la fabrication (A, 7j; B, 15j; C, 28j et D, 49j).

Entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine, la structure du fromage ne semble pas changée et le réseau protéique est bien visualisé avec présence de différents microorganismes à l'intérieur. A notre avis c'est cette structure qui permet l'égouttage continu du lactosérum à travers les perforations de la peau, ceci est encore une fois une particularité de la fabrication du fromage *Bouhezza*. Cette microstructure est en concordance avec les remarques de TUCKEY (1964) cité par KALAB (1979) où il précise que les protéines sont sous forme de granulés comme une surface active et sensible qui, dans des conditions normales, agit comme une membrane semi-perméable, ce qui permet la passage du lactosérum.

Les résultats de l'observation du *Bouhezza* par le microscope confocal, durant la dernière semaine de fabrication affinage (9-10 semaines), sont données en figure 47.

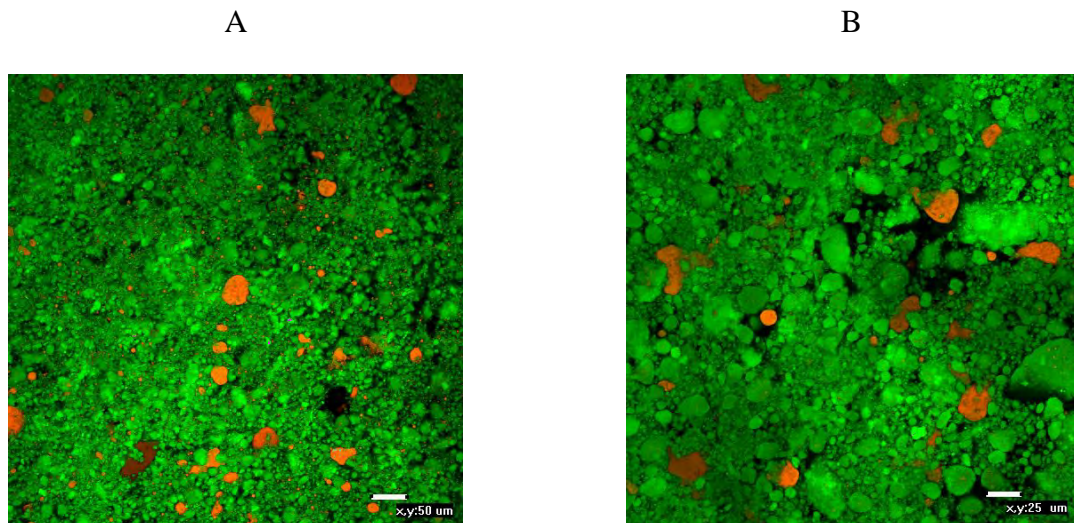


Figure 47 : Observations au microscope confocale du *Bouhezza* affiné (9 -10 semaines d'âge). (A) 20X (B) 20 X à un zoom = 2,00. Protéines colorées en vert et lipides en rouge en rouge.

Comme dans l'observation au microscope au MEB, le microscope confocal montre qu'à la dernière semaine de fabrication, que la structure du fromage *Bouhezza* est caractérisée par des agrégats protéiques organisés dans une matrice ouverte. Dans cette matrice protéique, colorée en vert, les lipides (colorées en rouge) avec des tailles hétérogènes et ainsi que le lactosérum (zone noire) ont dispersés sur toute la surface. Ces caractéristiques sont typiques d'un fromage à pâte molle et crémeuse.

La microstructure des fromages est non seulement liée à l'opération d'affinage mais aussi aux différentes conditions de fabrication, y compris, le type de coagulation (avec ou

sans présure), type d'égouttage (avec ou sans pression) et type de chauffage (avec ou sans chauffage). Dans les fromages frais le réseau protéique est granuleux constitué par des petits grains de caillé. Les protéines et les globules gras sont peu modifiés et ils ne sont pas bien fusionnés, gardant la même forme et taille qu'ils avaient dans le lait d'origine. Cependant, dans les fromages affinés la structure montre que les caséines sont bien fusionnées et la matière grasse laisse des ouvertures dans la matrice protéique. Les fromages à pâte molle à coagulation mixte montre un réseau protéique où les protéines sont bien fusionnées et la matière grasse solubilisé laisse des empreintes sphériques en creux dispersée dans le réseau. En effet la présure permet la fusion des protéines entre elles (AUTY *et al.*, 2010). *Bouhezza* est un fromage à coagulation lactique, il ressemble plus aux caillés coagulés.

II.5.3. Profil sensoriel de *Bouhezza*

Le profil sensoriel de *Bouhezza* est caractérisé par la famille d'odeurs et de goûts, lactique. Les notes données pour l'ensemble de caractéristiques détectées (texture-aspect, goût et odeurs) sont représentées dans la figure suivante (Fig. 48).

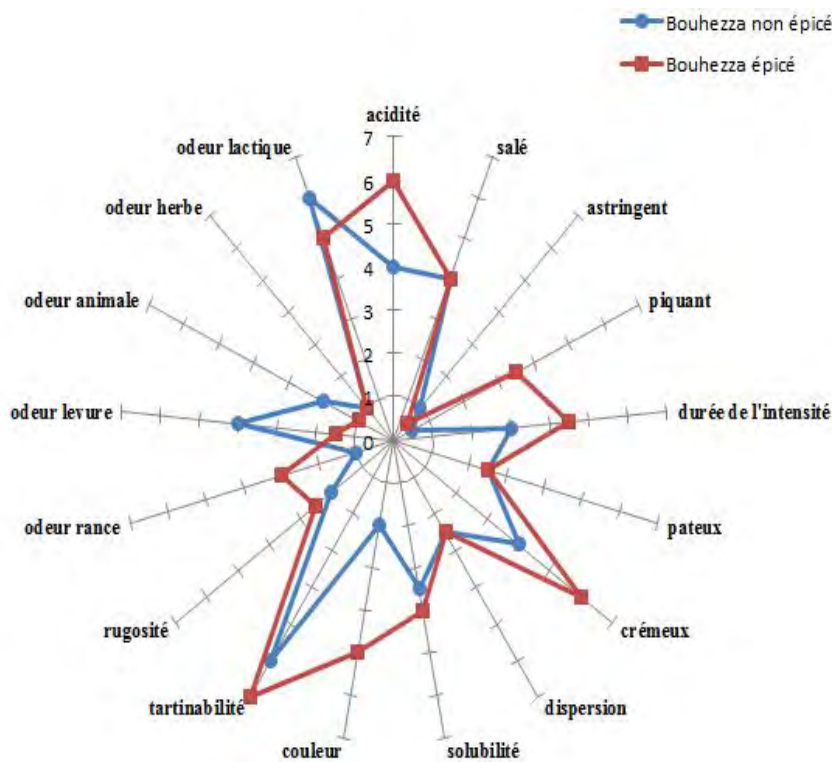


Figure 48 : Roue goût et odeur du fromage *Bouhezza* épicié et non épicié

Le goût de *Bouhezza* est intense, caractérisé par son acidité assez exprimée (note moyenne de 4/7 et 6/7, respectivement du fromage non épicié et épicié), une saveur salée

moyenne et un piquant prononcé dans le fromage épicé (note de 3,5/7). Du point de vue de sa consistance, *Bouhezza* a une tartinabilité importante, c'est une pâte crémeuse (note moyenne de 4/7 et 6/7, respectivement du fromage non épicé et épicé) et soluble dans la bouche. Concernant les odeurs, l'odeur des levures est plus masquée et celle de rance est plus importante dans le fromage épicé.

L'ensemble de ces caractéristiques sensorielles sont en adéquations avec les résultats des caractérisations précédentes (composition, arômes, texture et rhéologie) et montrent la richesse du profil sensoriel du fromage *Bouhezza*.

Conclusion partielle

La consistance de la pâte du fromage *Bouhezza* évolue au cours de la fabrication suite à l'évolution de l'extrait sec du fromage. En effet, le liquide du *Lben* se transforme en caillé puis en fromage. Ceci est aussi constaté par l'évolution des profils de la texture et des changements dans les indices d'écoulement de la pâte durant l'affinage.

L'observation au MEB et MCBL de *Bouhezza* montre une structure protéique compacte et creusée. Les micelles de caséines ne semblent pas être complètement fusionnées entre elles. Ce qui permet l'exsudation du lactosérum et l'égouttage continu du fromage à travers les perforations de la peau de chèvre « *Chekoua* ».

Le profil sensoriel de *Bouhezza* est assez riche par rapport à son goût et odeurs.

II. 6. Caractéristiques de la *Chekoua* (Djeld) de Bouhezza

La partie suivante est consacrée à l'étude de l'écosystème microbien de la *Chekoua* de Bouhezza. Comme déjà énoncé dans les résultats d'enquête (cf I.2.4. Rinçage de la *Chekoua* avec du *Lben*), la peau de chèvre destinée à la fabrication du fromage est d'abord putréfiée, dépilée, puis traitée avec le sel et le genièvre pendant au moins 5 jours. Selon 75% des enquêtés, après nouaison, un volume du *Lben* (1 à 2 L) est versé à l'intérieure de la *Chekoua* et est laissée quelques heures à une nuit pour compléter son nettoyage. Ensuite, le *Lben* est jeté et la *Chekoua* est rincée à nouveau à l'eau et utilisée directement dans la fabrication de Bouhezza. Cette partie d'étude, vise donc l'identification de l'écosystème microbien de cette peau de chèvre après traitement avec le sel et le genièvre et ensuite après rinçage avec du *Lben*. Elle nous permettra de constater l'éventuel rôle microbiologique de la peau dans la fabrication du fromage. L'étude a été réalisée sur deux peaux de chèvre et sur le *Lben* de rinçage. Pour illustrer les premiers échanges entre contenant-contenu (*Chekoua-Lben*), un échantillon de *Lben* a été prélevé après 10 min (Lb 10 min) puis après une nuit de contact (Lb 16 h).

II.6.1. Ecosystème des *Chekouates* et du *Lben* avant rinçage

Les résultats de la recherche des différentes flores microbiennes des biofilms des *Chekouates*, Ch₁ et Ch₂, sont illustrés dans la figure 49.

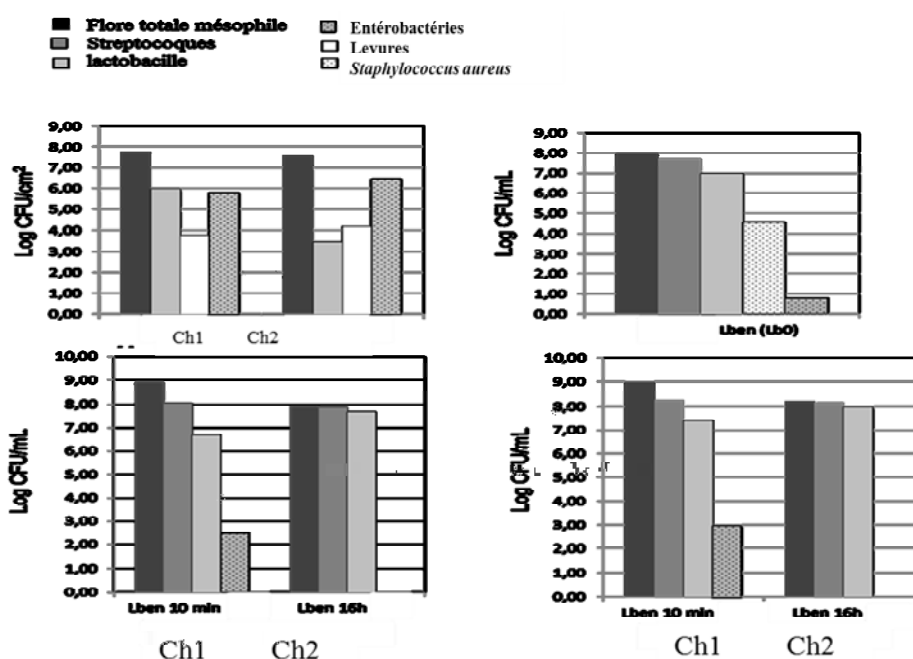


Figure 49 : Ecosystème de la *Chekoua* et du *Lben*

Le dénombrement de la flore mésophile totale des peaux avant contact avec le *Lben* de rinçage été respectivement de 7,74 et 7,56 log ufc/cm² pour Ch₁ et Ch₂. Le groupe des entérobactéries été le plus important avec une charge de 5,79 et 6,46 log ufc/cm² respectivement dans Ch₁ et Ch₂. Une charge plus faible pour les levures a été notée (4 log ufc/cm²). Par ailleurs, certains groupes bactériens sont complètement absents, il s'agit des lactocoques mésophiles, des moisissures et de *Staphylococcus aureus*. D'autre part, la flore pathogène recherchée par le système BAX[®] sur la surface des deux *Chekouates* avant rinçage avec le *Lben* a démontré l'absence totale des pathogènes : *Listeria monocytogenes*, *E.coli O157:H7* et *Salmonella*. Une étude comparable à ce travail, sur un autre type de contenant du lait pour la fabrication fromagère, le « Tina » du fromage Ragusano, a montré l'absence d'agents pathogènes (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli O157:H7*), démontrant l'innocuité de la cuve en bois utilisée dans la fabrication artisanale (LORTAL *et al.*, 2009).

Le *Lben*, préparé pour le rinçage de la *Chekoua*, est caractérisé par la présence des bactéries lactiques mésophiles : les lactocoques et les lactobacilles avec une charge respective moyenne de 7,7 log ufc/mL et 7 log ufc/mL. Cependant, les levures sont présentes avec une charge beaucoup plus faible (< 2,18 log ufc/mL) et les moisissures sont complètement absentes. La charge des bactéries lactiques est proche de celle donnée pour le *Lben* traditionnel par SAMET-BALI *et al.* (2010) évaluée à 8 log ufc/ml, cependant les levures et moisissures sont beaucoup plus importantes.

II.6.2. Ecosystème de la *Chekoua* et du *Lben* après rinçage

La figure 49 schématise le changement de la microflore des différents échantillons du *Lben* prélevés après 10 min et 16 h de contact dans la *Chekoua*. La microbiologie du premier échantillon du *Lben* (Lb10 min) montre une légère augmentation des lactocoques mésophiles avec une valeur de 8 ufc/mL pour Lb Ch₁ et 8,3 ufc/mL dans Lb Ch₂. Toutefois les lactobacilles ont évolué différemment dans les deux *Chekouates*, ils ont légèrement diminué dans Ch₁ (6,6 ufc/mL) et augmenté dans Ch₂. Ensuite et après 16h de contact, les lactobacilles ont augmenté dans les deux *Chekouates* (7,6 et 8 log ufc/ml dans Lb Ch₁ et Lb Ch₂).

De leur part, les *Chekouates* se sont enrichies en microorganismes, principalement les bactéries mésophiles lactiques. La flore pathogène dans le biofilm des *Chekouates* après rinçage avec le *Lben*, ainsi que dans tous les échantillons de *Lben* (Lb₀, Lb_{10 min} et

M. ADN génomique marqueur., 1 lait cru ; 2 *Lben* préparé ; 3 biofilm frais de la *Chekoua* (Ch1) ; 4 *Lben* après 10min. dans Ch1 ; 5 *Lben* après 16 h dans Ch1 ; 6 biofilm frais de la *Chekoua* (Ch2) ; 7 *Lben* après 10min. dans Ch2 ; 8 *Lben* après 16 h dans Ch2.

Tableau 25: Liste des microorganismes du marqueur de référence
(PARAYRE *et al.*, 2007)

Bande	Espèces ou sousespèces
a.	<i>Lb. plantarum/Lb. johnsonni/Lb. gasseri</i>
b.	<i>Lb. fermentum</i>
c.	<i>Leuconostoc cremoris/Ln. mesenteroides</i>
d.	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>
e.	<i>E. faecium</i>
f.	<i>E. faecium/Lb. brevis</i>
g.	<i>Lb. brevis</i>
h.	<i>S. xylosus</i>
i.	<i>Lb. brevis/S. xylosus</i>
j.	<i>Lb. helveticus/Lb. acidophilus/Lb. crispatus</i>
k.	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
l.	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
m.	<i>E. faecalis/S. succinus</i>
n.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>
o.	<i>S. carnosus</i>
p.	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
q.	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus/Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
r.	<i>Lb. buchneri</i>
s.	<i>B. cereus/B. licheniformis</i>
t.	<i>S. thermophilus</i>
u.	<i>E. coli</i>
v.	<i>B. breve/Hafnia alvei</i>
w.	<i>C. variabile</i>
x.	<i>C. flavescens/ B. pumillus</i>
y.	<i>M. gubbeenense/Lb. reuteri</i>
z.	<i>Bifidobacterium longum</i>
Φ	<i>Lb. paracasei/Lb. casei/Lb. rhamnosus/Lb. zaeae/B. infantis</i>
Ω	<i>Corynebacterium casei</i>
α	<i>Arthrobacterium nicotianae/A. globiformis/B. tyrophenmentas</i>
β	<i>Propionibacterium microaerophilum</i>
γ	<i>B. alimentarium/B. linens</i>
δ	<i>P. acidipropionici</i>
ε	<i>B. casei</i>
η	<i>P. jensenii/P. thoenii</i>
θ	<i>P. freuderechii</i>
μ	<i>P. cyclohexanicum</i>
s ?	<i>Unknown band</i>

Le profil des *Chekouates* a révélé la prédominance de bandes correspondantes à *E. faecalis* et à *Streptococcus thermophilus*. Aussi, *Lb fermentum* a été présente mais avec

une intensité plus faible. *Lb brevis* présente la bande la plus distinguée dans Ch₁ et *Lb helveticus* dans Ch₂. D'autre part, des espèces avec un pourcentage élevé en GC ont été détectées. Ces résultats montrent la diversité de l'écosystème de la *chekoua* avec présence d'espèces appartenant au groupe des bactéries lactiques et à d'autres groupes.

Les échantillons de *Lben* prélevés à temps 0, 10min et 16h de contact avec *chekoua* montre la dominance de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* et *Streptococcus gallolyticus subsp.macedonicus* et l'apparition de deux bandes qui correspondent à *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus* et à *Lb. plantarum*. Les bandes correspondantes à *Lb. brevis* et *Staphylococcus equorum subsp linens* ont été détectés seulement dans les échantillons de *Lben* prélevés après 10min et 16 heures de contact.

En comparaison avec l'étude entreprise par SENOUSSE (2013), il ressort que la peau est assez riche en espèces et que cinq bandes dans nos profils sont communes, elles correspondent aux espèces : *Lb. plantarum/Lb. johnsonni/ Lb. gasseri(a)*, *Lb. fermentum (b)*, *Staphylococcus equorum subsp. linens*, *Streptococcus thermophilus* et *Lb. paracasei/ Lb. casei/ Lb. rhamnosus/ Lb. zaeae/B. infantis (Φ)*. D'autre part, la variabilité de l'écosystème microbien de la peau de chèvre était en accord avec les résultats trouvés par LICITRA *et al.* (2007) qui ont rapporté que le profil TTGE des cinq biofilms de tina (cuve en bois utilisée dans la fabrication du fromage *Ragusano*) provenant de cinq fermes différentes a confirmé la dominance des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *L. lactis* et *lactobacillus delbrueckii. Subsp. lactis*) avec la présence de quelques espèces bactériennes de haut pourcentage GC comme les bactéries corynéformes.

La bande inconnue à faible GC a apparue dans le profil TTGE de la peau de chèvre et dans le *Lben*. Cette bande a été aussi signalée par SENOUSSE (2013) sur d'autres peaux de *Bouhezza*. Nous avons signalé la présence de cette bande dans les échantillons du fromage *Bouhezza* à 21 j d'âge. L'hy gorigine de cette bande est, probablement donc, la *Chekoua*.

II.6.4. Observation microscopique de la *Chekoua* de *Bouhezza*

II.6.4.1. Aspect de la surface de la *Chekoua*

L'observation microscopique (MEB) a révélé que la surface de la *Chekoua* de chèvre est ridée caractérisée par des plis cutanés (Fig. 51). Les fibres sont assez épaisses et bien distinctes dans la peau fraîchement préparée avec apparition des pores bien distincts. D'autre part, les observations microscopiques comparées du MEB et du MCBL

(Fig. 51 et 52) ont montré l'enrichissement microbien du biofilm de la *Chekoua* après contact avec le *Lben*. Les micro-organismes visualisés sont des sous forme de diplocoques, de bacilles et de levures.

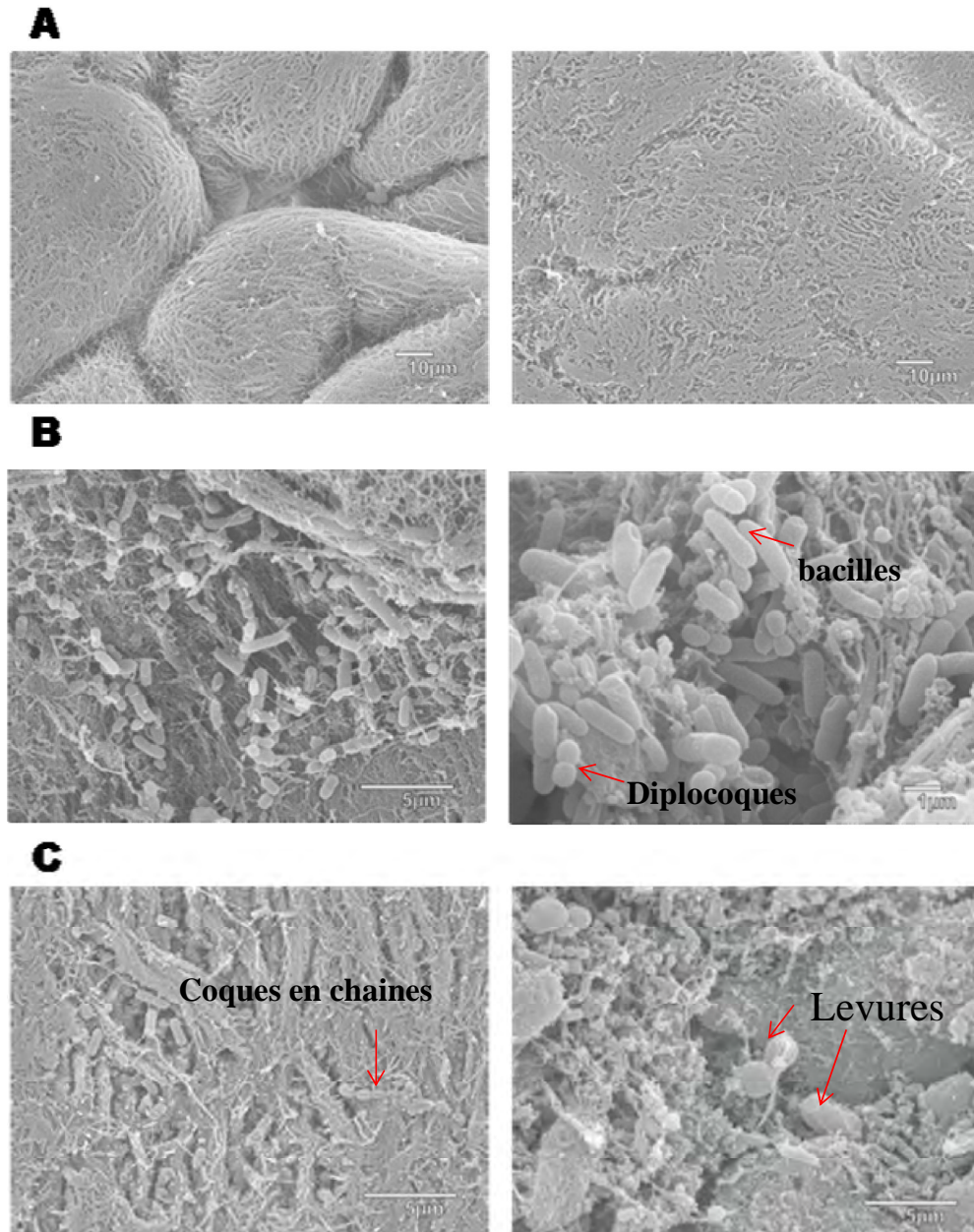


Figure 51° Micrographes du MEB de la *Chekoua* du fromage *Bouhezza* avant et après une nuit de contact avec le *Lben*.

Plis cutanés profonds dans les sacs de peaux de chèvre (Ch) et surface douce des peaux de chèvre après rinçage avec le *Lben* (Ch lb, 1000X (a), colonies des bactéries des *Chekouates* après contact avec le *Lben* (5000X). Bacilles et diplococci prédominants (10000X) (b) et les diplococci en chaînes courtes et des colonies des levures isolées après contact avec le *Lben* (5000X)(c).

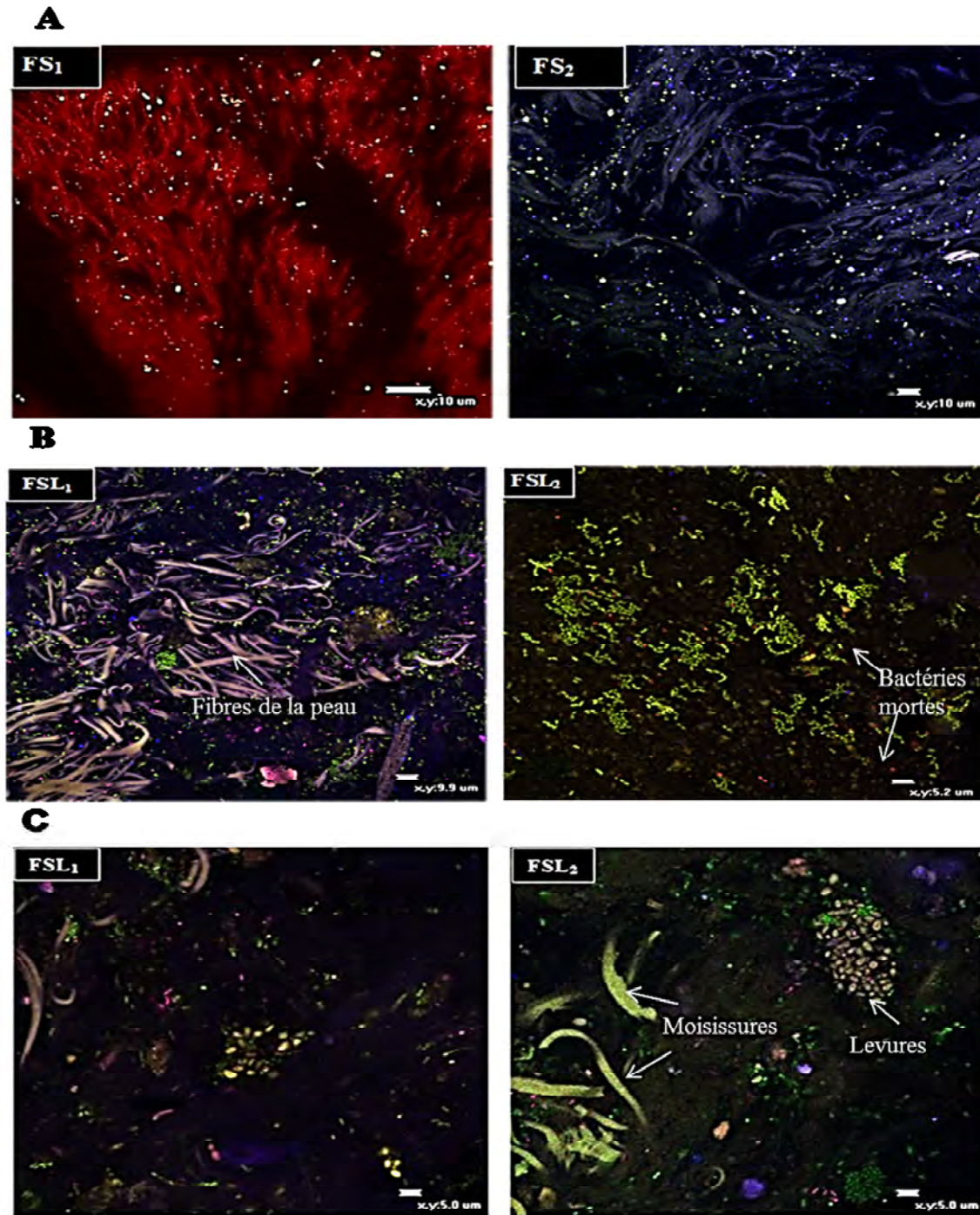


Figure 52 : Micrographes du MCBL des *Chekouates* de *Bouhezza* avant contact avec *Lben* (Ch1 et Ch2) (A) et après une nuit de contact (ChL1 et ChL2) (B). Cellules des levures retrouvées dans les *Chekouates* (C).

L'étude de la peau de chèvre avec le microscope confocal à balayage laser permet de caractériser d'une part la microstructure de la peau et d'autre part la viabilité et la répartition des micro-organismes sur le biofilm de la peau (Fig. 52).

Conformément aux observations de la MEB, les peaux examinées avant l'addition du *Lben* ont montré une faible densité bactérienne en comparaison avec les échantillons de peau analysés après contact avec *Lben*. Les bactéries ont été apparues principalement organisées en chaînes, en diplocoques et aussi quelques levures isolées. Certaines cellules apparaissent mortes. Les *Chekouates* après contact avec le *Lben* ont été colonisées par un grand nombre de bactéries et par quelques levures.

II.6.4.2. Taille des perforations de la peau

L'observation au microscope électronique a permis de bien visualiser les perforations de la *Chekoua* de *Bouhezza*. D'après la figure 53, les observations au MEBE montrent, sur la même surface de la peau de chèvre des perforations de diamètre très variable (différentes tailles ($<$ inférieure à $50\mu\text{m}$ ou $>$ $100\mu\text{m}$)).

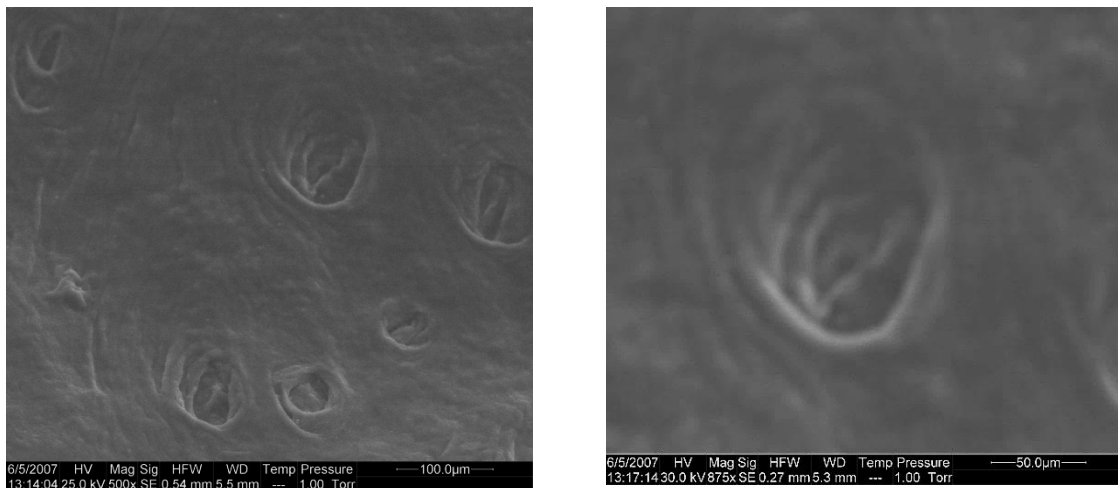


Figure 53 : Observation au microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) des perforations de la peau de chèvre utilisé dans la fabrication de *Bouhezza*

Selon les résultats de SENOUSI (2013), la taille des perforations de la *Chekoua* a été évaluée par variant entre 41 et 140 μm soit 41000 et 140 000 nm. Sachant que la taille des micelles de caséines est entre 50–250 nm et celle des globules gras est de 0,1- 10 nm (AUTY, 2011) ; et que le lactosérum égoutté à travers les perforations de la peau est exempté de matière grasse, et d'autre part selon l'aspect des perforations (Fig. 53), il nous semble que les pores de la *Chekoua* sont sous forme conique qui se rétrécissent tout au long de l'épaisseur de la peau, permettant ainsi une ultrafiltration au cours de l'égouttage. Une étude plus approfondis permettra de vérifier cette hypothèse.

Conclusion partielle

A travers cette partie d'étude, nous apportons notre contribution à la caractérisation microbiologique de la peau de chèvre (*Chekoua ou Djeld*) utilisée dans la fabrication du fromage traditionnel «*Bouhezza*». L'écosystème microbien de la peau de chèvre par la PCR-TTGE a montré une diversification avec la prédominance des bactéries lactiques. Un échange de microorganismes a été noté entre la *Chekoua* et le *Lben* tout au long du contact. L'observation microscopique (MEB et MCBL) a montré l'enrichissement microbien de biofilm de la *Chekoua* après contact avec le *Lben*. Les microorganismes présents sont sous forme de diplocoques, de bacilles, et levures, avec peu de moisissures. La surface de la peau comporte des perforations de différentes tailles de forme conique, assurant l'égouttage du fromage.

III. Fiche technique du fromage traditionnel *Bouhezza*

L'objectif final de cette recherche, développée dans les parties précédentes est d'établir une fiche technique descriptive détaillée du fromage traditionnel algérien *Bouhezza*. L'ensemble des résultats obtenus avec ceux des travaux de AISSAOUI ZITOUN (2004), SAOUDI (2012), BELBELDI (2013) et SENOUSSE (2013) ont permis l'enrichissement de la fiche initiale. Les caractéristiques définies, ci-après, sont établies selon le modèle proposé par FOX (1993) (Annexe I) :

Fiche technique du fromage traditionnel algérien *Bouhezza*

<p>1 Type de lait Lait cru de vache, de chèvre, et /ou de brebis</p> <p>2 Type de ferment (Starter) fermentation naturel <i>Lc. lactis</i> et <i>L. plantarum</i> principales espèces</p> <p>3. Coagulant acide</p> <p>4. Température : ambiance période printemps-été</p> <p>5. Température de cuisson : pas de cuisson</p> <p>6. pH à l'égouttage du lactosérum : pH du <i>Lben</i> 4,8 à 5 Egouttage spontané dans une peau «<i>Chekoua</i>» non imperméabilisée</p> <p>7. Caillé pressé : non</p> <p>8. Salage: en masse (avec le <i>Lben</i>) : 20 g/L</p> <p>9. Caillé étiré (pâte filée) Non</p> <p>10 Composition,% Gras/Sec : de 21 à 39 % ; humidité : 65 à 77% ; protéines dans l'extrait sec : 43,5 à 56,7%. Sel : 2,2 g/100 g</p> <p>11 pH : 1 jour : 4,6 Affiné : 3,7 et 4.</p> <p>12 Consistance Pâte semi-molle à molle</p> <p>13 Affinage: Durée : de 1 à 5mois température et humidité périodes printemps-été, climats des hauts plateaux [26,8 ± 4 °C et 52,6 ± 8.4 %]</p>	<p>14 Saveur : acide et piquant</p> <p>15. intérieur: Pâte sans ouvertures</p> <p>16. microflore secondaire Levure et moisissures non identifiés</p> <p>17. Indices de maturité pH 3,7 à 4 NT soluble à pH 4, 6 : entre 7,8 et 15 % NT soluble dans TCA 12 % : entre 5,4 et 13,6% azote total d'acides aminés libres (en %) / caséine α hydrolyse intense caséine β hydrolyse partielle Acides gras libres, (m Eq / kg) : / L'acide lactique (%) de 1 à 2,5 g/100 g Isomère de l'acide lactique (D, L) / Est-ce que l'acide lactique subit changement?</p> <p>18. Apparence physique : Forme : pâte de couleur blanche crème avec présence de tâches rouge du piment rouge piquant</p> <p>19. Volume de production (tonnes / an) : non estimé</p> <p>20. Fromage sans appellation d'Origine Protégée</p> <p>21. Synonymes: des variétés apparentées /</p> <p>22. Autres informations importantes -Terroir: <i>Chaouia</i> (Est algérien : Batna, Oum El Bouaghi, Khenchela et Tébessa) ; Dénomination : <i>Bouhezza</i> ou dans quelques localités <i>Boumlel</i>, <i>Malh Dh'ouab</i> et <i>Boumlih</i> ; - Spécifications : - fabrication dans la peau de chèvre dénommée <i>Chekoua</i> ou <i>Djeld</i> avec des ajouts successifs du lait fermenté « <i>Lben</i> », salé plusieurs semaines puis du lait cru entier ; peau traité avec le sel et le genièvre et rincé avec le <i>Lben</i> ; égouttage continu à travers les perforations de la peau ; fromage affiné épicé avec la poudre ou la pâte de piment rouge. - Arômes : composés aromatiques clés : 7 esters (ethyl butanoate, propyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl heptanoate, ethyl octanoate, 2-phenylethyl acetate, ethyl nonanoate), 1 acide (octanoic acid), 1 alcool (3-methyl, 1-butanol) et 1 cétone (2-nonanone)</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A l'issue de cette recherche, nous apportons notre contribution à la description d'une pratique traditionnelle ancestrale appartenant au patrimoine culturel algérien. A travers le fromage *Bouhezza* que nous nous sommes fixés d'étudier, en se basant sur une enquête et des expérimentations sur le fromage, nos résultats révèlent beaucoup d'informations intéressantes sur son savoir-faire longtemps existant chez les populations des *Chaouia* mais non connus par nombreux algériens eux-mêmes. La délimitation géographique de la zone de fabrication de *Bouhezza* a fait ressortir les populations *Chaouia* couvrant les wilayates d'Oum El Boughi, de Batna, de Khenchela et de Tébessa. D'autre part, le diagramme de fabrication le plus prépondérant a été vérifié et confirmé. Cette fabrication nécessite une préparation particulière d'une outre, contenant de la masse fromagère appelé « *Chekoua ou Djeld* ». La fabrication est lancée souvent à partir de *Lben* additionné de sel avec des ajouts répétés de *Lben* ou lait dans cette outre en peau de chèvre ou de brebis, suspendue pour laisser s'égoutter spontanément le lactosérum. La peau animale utilisée joue le rôle à la fois de contenant de la masse fromagère et de séparateur de phase (ultrafiltre). De nos jours, le *Lben* de vache semble le plus utilisé mais les *Lbens* caprins et ovins ou de mélange peuvent l'être aussi selon les disponibilités de l'élevage des familles. La fabrication de *Bouhezza* est lancée avec le *Lben* salé les déclarations de 95,80% des familles enquêtées qui fabriquent *Bouhezza*, mais est terminée avec ajout du lait cru pour finaliser la maturation du fromage en corrigeant l'acidité et le taux de sel dans la pâte. La matière première au démarrage et pendant les ajouts est salée en masse à raison de 20 à 25 g/L de *Lben* ou lait ajouté. Le produit final souvent épicé pour la consommation avec la poudre de piment rouge piquant, parfois non, se présente comme une pâte tartinable blanchâtre ou rosée.

Différents échantillons du fromage *Bouhezza* de fermes, affinés de 30 à 150j, en nombre de 22, ont été collectés de différentes wilayas (Oum El Bouaghi, Khenchela et Batna) et ont servis à la caractérisation expérimentale. D'autre part, le diagramme de fabrication déduit des informations de l'enquête à travers six fabrications contrôlées a permis la confrontation des fromages obtenus après 70j d'affinage aux résultats de caractérisation de *Bouhezza* de fermes.

La comparaison des caractères microbiologiques des fromages a permis de conclure que *Bouhezza* est le sein d'un peuplement microbien assez important (8 log ufc/g). Ce peuplement est caractérisé par la prédominance des streptocoques lactiques et des lactobacilles dont la charge varie de 5 à 7 log ufc/g et de 6 à 7 log ufc/g, respectivement dans les fromages de fermes et d'expérimentations. La flore secondaire est représentée par

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

la flore levures et moisissures (4 à 6 log ufc/g). Dans l'ensemble des échantillons de *Bouhezza*, de fermes et d'expérimentations, l'absence de la flore pathogène a été confirmée par la recherche de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, and *E. coli O157H7*. Les risques de contamination sont notés par la présence des coliformes totaux, cependant les coliformes fécaux sont en faible charge voire absence dans les fromages affinés (<1 log ufc/g). Ce résultat est très important dans la qualité hygiénique du fromage où la fabrication est basée sur l'emploi de *Lben* et de lait cru dans le contenant en peau de chèvre durant toute la période de fabrication. En revanche, les critères physicochimiques du *Bouhezza* d'expérimentations sont globalement, en moyenne, compris dans les intervalles des valeurs trouvés pour le *Bouhezza* de fabrications fermières. La comparaison a permis de dégager que l'extrait sec total (EST en g /100 g de fromage) et la matière grasse exprimé en Gras /Sec dépendaient de l'âge du fromage. La teneur en EST est près de 20-25 % pour les fromages plus jeunes (à environ un mois d'affinage) est de 30-35 % pour les fromages ayant séjourné plus longtemps dans la *Chekoua* et âgés de 2 mois et plus et ayant perdu plus d'eau par égouttage. Concernant la teneur en Gras/Sec elle est de 21 à 39 g/100g de matière sèche dans les fromages affinés. D'autre part, la teneur minimale en protéines du *Bouhezza* est de 12 g /100g de l'EST. Cette teneur varie largement dans les fromages de ferme (de 43 à 54 %) par rapport aux fromages d'expérimentations (de 50 à 56 %). Les fromages issus des fabrications contrôlées rejoignent ceux provenant de fabrications fermières par l'ensemble des caractéristiques physicochimiques : pH (3-4), acidité (4 à 6 g/100g d'EST) et teneur en sel (6 g/100g d'EST).

L'ensemble des caractères, microbiologiques et physicochimiques précités, permet de confirmer le diagramme traditionnel adopté dans notre expérimentation. Entre autre, et vu la particularité de la fromagerie de *Bouhezza*, sa classification selon le *Codex Alimentarius* est possible : *Bouhezza* est un fromage à pâte molle ou peu molle, mi gras (taux MGES de 30 %), affiné principalement dans la masse.

En ce qui concerne l'affinage du fromage *Bouhezza*, **l'identification de la flore lactique**, par la méthode de la PCR-TTGE et la méthode morphologique et biochimique, ont montré une bonne diversification dans cette flore. L'analyse de la PCR-TTGE, a révélé la présence régulière dans tous les fromages, de fermes ou d'expérimentations, de *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis*. Aussi, dans les fromages de fabrications contrôlées, une évolution remarquable dans les profils de la PCR-TTGE a été notée après ajout du lait cru, marquée par l'apparition de nouvelles bandes et la diminution de l'intensité d'autres. D'autre part, les résultats de l'identification biochimique ont montré

que *Lactobacillus* est le genre dominant des bactéries lactiques et que les coques identifiées appartiennent aux genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*, avec prédominance du genre *Leuconostoc*.

La protéolyse dans le fromage *Bouhezza* varie entre les échantillons de 7,85 à 15 % d'NS à pH 4,6 par rapport à l'NT et de 5,4 à 13,6% d'NNP par rapport à l'NT. Le profil électrophorétique de l'urea-PAGE montre que groupe de la caséine α_s semble subir une hydrolyse plus intense que celui du groupe de la caséine β . Plusieurs peptides issus de la dégradation des deux caséines ont été identifiés. **La lipolyse** dans le fromage *Bouhezza* a induit la présence d'acides gras libres saturés à chaîne courte, moyenne et longue. Les acides palmitique et stéarique sont les plus importants. La présence d'acide gras mono-insaturé (ac. Palmitoléique et 13-Octadecenoïque), poly-insaturés (ac. linoléique et linoélaïdique) et à nombre impaire d'atome de carbone a été aussi marqué. L'acide 13-Octadecenoïque est l'acide gras insaturé le plus important.

Le profil aromatique du *Bouhezza* est principalement constitué par les esters et les aldéhydes. D'autres composés de différentes classes chimiques sont détectés par la technique de GC/MS et de GC/MS/Olfactométrie. L'analyse par le nez électronique a révélé quelques différences entre les empreintes des composés volatiles de *Bouhezza* de ferme. La GC/MS et la GC/MS/O ont permis de définir des composés odorants clés dans le profil aromatique du fromage *Bouhezza*. Ces composés sont liés à différentes odeurs (d'ail, de pomme, butyrique, d'orange / citron, de lait, ...) montrant la richesse du profil aromatique de *Bouhezza*. La pâte du fromage *Bouhezza* est peu molle. Elle change de consistance durant la fabrication passant de l'état d'un liquide, le *Lben*, à un corps pseudo-plastique. Ceci se confirme avec les résultats **de la rhéologie et du profil de la texture du fromage**. **L'analyse sensorielle** décrit le *Bouhezza* avec un goût peu piquant et une acidité assez prononcée. La saveur salée est moyenne.

La dernière partie de ce travail consacrée à **l'étude de la *Chekoua*** du fromage *Bouhezza* a permis de confirmer son rôle dans la fabrication non seulement comme contenant inerte de la masse fromagère mais aussi comme agent microbiologique qui peut avoir une influence sur son affinage et la mise en évidence d'un échange microbien entre eux (*Chekoua* et *Lben*). Ceci est confirmé par l'observation microscopique (MEB et MCBL). **En terme de perspectives**, ce travail mériterait d'être complété par plus de recherches sur l'affinage du fromage *Bouhezza*, au lait de vache, de chèvre ou de mélange, et sur la *Chekoua*, en peau de chèvre ou de brebis.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.F.N.O.R., 1993.** Recueil de normes françaises. Contrôle de la qualité de produits alimentaires: Laites et produits laitiers. Analyses physicochimiques. Afnor-dgccrf. (4^{ème} ed.). Paris: La Défense, p562.
- A.F.N.O.R., 1995** Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Analyse sensorielle. Recueil de normes françaises, 5^{ème} édition, Paris: La Défense, 400 p.
- ABRIOUEL, H., MARTÍN-PLATERO, A., MAQUEDA, M., VALDIVIA, E., MARTÍNEZ- and BUENO, M. 2008.** Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 200-208.
- ACREE T.E. and BARNARD J., 1994.** Gas chromatography-olfactometry using charm analysis. Proc 7th Weurman Flavour Research Symposium, Amsterdam, Netherlands.
- ACREE T.E., BUTTS R.M., NELSON R.R. and LEE C.Y., 1976.** Sniffer to determine the odour of gas chromatographic effluents. *Analytical Chemistry*, 48, 1821–1822.
- ADAMO, C., 2003** Guide d'évaluation olfacto-gustative des fromages à pâte dure et semi-dure. Édition miguidef.doc, Version abrégée.
- ADDEO F., GARRO G., INTORCIA N. PELLEGRINO L., RESMINI P. and CHIANESE L., 1995.** Gel electrophoresis and immunoblotting for the detection of casein proteolysis in cheese. *J. Dairy Res.*, 62, 207-309.
- AISSAOUI ZITOUN O., 2004.** Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle algérien « Bouhezza ». *Thèse de Magistère.* Université Mentouri de Constantine. 134p.
- ALAIS C. et LINDEN G., 1997.** Abrégé de biochimie alimentaire. 4^{ème} éd. , Masson, 248 p.
- ANDIÇ S., TUNÇTÜRK Y., BORAN G., 2015.** Changes in Volatile Compounds of Cheese, Chapter 28 – Processing and Impact on Active Components in Food, Pages 231–239, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046993000287> , consulté online le 5 Juin 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00028-7.
- ANDREWS, A. T. 1983.** Proteinases in normal bovine milk and their action on the caseins. *J. Dairy Res.*, 50, 45-55.
- ANONYME, 2007.** BAX® System User Guide, DuPont Qualicon, I-1 p.
- ATTIA H., BENNASAR M. and DE LA FUENTE B.T., 1991.** Study of the fouling of inorganic membranes by acidified milks using scanning electron microscopy and electrophoresis: I. Membrane with pore diameter 0.2 µm. *J. Dairy Res.*, 5, 39-50.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ATTIA H., KHERONATOU N. et AYADI J., 2000.** Acidification chimique directe du lait. Corrélations entre la mobilité du matériel micellaire et micro et macrostructure des laits acidifiés. *Sci. des aliments*, 20, 289-307.
- ATLAN D., AUBEL D. et GILBERT C., 2000.** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases de surface. *Sci. Aliments*, 230 (1), pp 5-17.
- AUTY M., 2011.** Microscopy (Microstructure of Milk Constituents and Products). *Analytical Methods*, 226-234.
- AUTY M.A.E., TOWMEY M., GUINEE T.P. and MULVIHILL, D.M., 2001.** Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *J. Dairy Res.*, 68, 417-427.
- AWAD S., 2006.** Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. *Food Chemistry*, 97, 394-400.
- BARBANO D.M., 1986.** Titratable acidity and lactose/galactose determination of cheese. *J. Dairy Sci.*, 68, 50-57.
- BÁRCENAS P., PÉREZ ELORTONDO F.J. and ALBISU M., 2005.** Sensory comparison of several of several cheese varieties manufactured from different milk sources. *J. of Sensory Studies*, 20, 62-74.
- BAYAR N. and ÖZRENK E., 2011.** The effect of quality properties on Tulum cheese using different package materials. *African J. of Biotechnology*, 10 (8), 1393-1399.
- BEDDIAR et BENHANAY H., 2006.** Caractérisation physico-chimique et microbiologique du fromage traditionnel algérien *Bouhezza* de ferme et de commerce (wilaya de Batna et de khenchela). *Mémoire d'ingénieur, INATAA*, Université Mentouri de Constantine. 67p.
- BELITZ H.D. and GROSCH W., 1986.** Food chemistry. In: *Aroma Substances*, D. Hadziyev (Ed). Translation from German, pp 257-303. Springer-Verlag, New York.
- BENMESSAI W. et FETHALLAH Z., 2009.** Suivi des caractéristiques physico-chimiques de *Bouhezza* au lait de vache et de mélange (vache et chèvre). *Mémoire d'ingénieur, INATAA*, Université Mentouri Constantine, 86p.
- BENNETT R.J. and JOHNSTON K.A., 2004.** General Aspects of Cheese Technology. Pp 23-50. In *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2 Major Cheese Groups*. Third edition, Ed. P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T M. COGAN and T.P. GUINEE. AMSTERDAM. 434p.
- BERESFORD T.M., FITZSIMONS N. A., BRENNAN N.L. and COGAN T.M., 2001.** Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, 11, 259-274.

- BERODIER F., LAVANCHY P., ZANNONI M., CASALS J., HERRERO L. and BERTOZZI L.Y. and PANARI, G., 1993.** Cheeses with Appellation d'Origine Contrôlée (AOC). Factors that affect quality. *Int. Dairy J.*, 3, 297–312.
- BERODIER F., LAVANCHY P., ZANNONI M., CASALS J., HERRERO L. et ADAMO C., 2003.** Guide d'évaluation olfacto-gustative des fromages à pâte dure et semi-dure. /11/05 miguidef.doc. Version abrégée, 26p.
- BOURGEOIS C.M., 1991.** La microflore aérobie mésophile totale. Dans Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. (BOURGEAIS C.M. et LEVEAU J.Y.), Ed. Tec. Et Doc.,
- BOURNE M.C., 2002.** Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement, 2nd ed. pp. 423. London: Academic Press.
- BRULE G., LENOIR J. et RAMET F., 1997.** Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage Chapitre 1 : La micelle de caséine et la coagulation du lait. Dans Le fromage (coord. ECK A. et GILLIS J.C.) p. 7, 3^{ème} ed. Tec et Doc. Lavoisier.
- BUGAUD C., BUCHIN S., HAUWUY A. and COULON J B., 2001.** Relationships between flavour and chemical composition of Abundance cheese derived from different types of pastures. *Le Lait*, 81, 757–773.
- BYNUM O.G. and BARBANO D.M., 1985.** Whole Milk Reverse Osmosis Retentates for Cheddar Cheese Manufacture: Chemical Changes During Aging. *J. Dairy Sci.*, 68, 1-10.
- CARPINO S., MALLIA S., LA TERRA S., MELILLI C., LICITRA G., ACREE T.E., BARBANO D.M., and VAN SOEST P.J., 2004.** Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: native pasture and total mixed rations. *J. of Dairy Sc.*, 87, 816–830.
- CARPINO S., RAPISARDA T., BELVEDERE G. and LICITRA G., 2008.** Volatile fingerprint of Piacentinu cheese produced with different tools and type of saffron. *Small Ruminant Research*, 79, 16–21.
- CARPINO S., RAPISARDA T., BELVEDERE G., PAPADEMAS P., NEOCLEOUS M., SCHADT I., PASTA C., and LICITRA G., 2010.** Effect of dehydration by sun or by oven on volatiles and aroma compounds of Trachanas. *Dairy Sci. Technol.*, 90, 715-727.
- CASEY M.G., HÄNI J.P., GRUSKOVNJAK J., SCHAEREN W., WECHSLER D., 2006.** Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Le Lait*, 86, 407–414.
- CASTARAS M.V., 1993.** Les indices de contamination fécale, partie III, chapitre 3 : Méthodes d'évaluation des microflores à incidence sanitaire. Dans techniques d'analyse et

- de contrôles dans les IAA, volume 3 : le contrôle microbiologique. (coord. C.M. BOURGEOIS et J.Y. LE VEAU), 2ème édition, Tec. et Doc, APRIA, pp 247-259, 454 p.
- CHAMBERS D. H., CHAMBERS IV E. and JOHNSON D., 2005.** Flavor description and classification of selected natural cheeses. *Culinary Arts and Sciences V: Global and National Perspectives*, (Coord. EDWARDS J.S.A., KOWRYGO B, & REJMAN, K.), pp 641-654, Publisher, Worshipful Company of Cooks Research Centre, Bournemouth, Poole, UK.
- CHAUMANDE B., 2011.** Apport des analyses protéomiques et métallogprotéomiques pour l'étude de la géophagie. *Thèse de doctorat*. Université de Strasbourg. 258p.
- CHILLIARD Y. et LAMBET G., 1987.** Action enzymatique. 2-1- La lipolyse. Dans le lait matière première de l'industrie laitière. *Cepid*. pp 241.
- CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPON J.C., LAMBER G., et LENOIR J., 1997 (a).** Biochimie de l'affinage. Dans *Le fromage* (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.), 3^{ème} ed. Tec et Doc. Lavoisier. pp 89.
- CHOISY C., DESMAZEAUD M., GUEGUEN M., LENOIR J., SCHMIDT J., et TOURNEUR C., 1997 (b).** Les phénomènes microbiens, Dans *Le fromage* (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.), 3^{ème} ed., Tec et Doc. Lavoisier. pp 377.
- COEURET V., DUBERNET S., BERNARDEAU M., GUEGUEN M., VERNOUX J-P., 2003.** Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83, 269–306.
- COPPOLA S., BLAIOTTA G., ERCOLINI D. and MOSCHETTI G., 2001.** Molecular evaluation of micro-bial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 414-420.
- COURROYE M., 1987.** L'indice d'affinage. Un nouveau moyen de suivre la protéolyse des fromages à pâte cuite par cryoscopie. *Les IAA*, mars, 169-173.
- CURIONI P. M. G., and BOSSET J. O., 2002.** Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.*, 12, 959–984.
- CUESTA, P., FERNANDEZ-GARCIA, E., GONZALEZ DE LLANO, D., MONTILLA, A. AND RODRIGUEZ, A. 1996.** Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of afuegal pitu cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 79, 1693-1698.
- DALGLEISHD.G., 1982.** The enzymatique coagulation of milk. In *developments in dairy chemistry - 1- Proteins* (Coord. FOX P.F.) A.S. Publishers, pp.157-188, 410 p.

- DE ANGELIS M. and GOBBETTI M., 2011.** Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. pp.78–90. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (Coord. FUQUAY J, FOX P, and MC SWEENEY P.), vol 3, 2ième édition, Academic press, Elsevier Science, San Diego. 4170 p.
- De. FREITAS I., PINON N., LOPEZ C., THIERRY A., MAUBOIS J.-L., LORTAL S., 2005.** Microstructure, physicochemistry, microbial populations and aroma compounds of ripened Cantal cheeses. *Le Lait*, 85, 453–468.
- DEGA E., DUPRE I., PABA A., SCHIRRU S., M.F. SCINTU and COMUNIAN R., 2011.** Fromage *Bouhezza* : Caractérisation microbiologique par la méthode culture-dépendante. Rapport du projet ISBN 978-88-87562-14-9, pp.49-55, CoRFiLaC, 142p.
- DELGADO F., GONZÁLEZ-CRESPO J., CAVA R. and RAMÍREZ R., 2011.** Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, 129, 1156–1163.
- DELLARAS C., 1998.** Microbiologie 90 h de travaux pratiques. Ed. (Gaëtan morin éditeur) EUROPE. 276 p.
- DOHMERS T., 1995.** Dairy Processing handbook, 436p.
- DORIOZA J.-M., FLEURY P. COULON J.B. and MARTIN M., 2000.** La composante milieu physique dans l'effet terroir pour la production fromagère quelques réflexions à partir du cas des fromages des Alpes du Nord. *Courrier de l'environnement de l'INRA* n°40, juin, 47-55.
- D.R.D.P.A., 2011.** Direction de la Régulation du Développement de la Production Agricole (Ministère de l'agriculture et du développement rural). Rapport 2010, Algiers, Algeria, p 124.
- DUNN H.C. and INDSAY R.C. 1985.** Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavours of Cheddar cheese. *J. of Dairy Sci.*, 68, 2859-2874.
- ERCOLINI D., 2004.** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. of Microbiological Methods*. 56, 297-314.
- FALLICO, V., MCSWEENEY, P.L.H., SIEBERT, K.J., HORNE, J., CARPINO, S. and LICITRA, G. 2004.** Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.*, 87, 3138–3152.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- FENELON M.A., O'CONNOR P. and GUINEE T.P., 2000.** The effet of fat content on the microbiology and proteolysis in cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 83, 2173-2183.
- FENSTER K.M., RANKIN S.A., and STEELE J.L., 2003.** Accumulation of Short *n*-Chain Ethyl Esters by Esterases of Lactic Acid Bacteria Under Conditions Simulating Ripening Parmesan Cheese. *J. Dairy Sci.*, 86, 2818–2825.
- FOX G.E., MAGRUM LJ, BALCH WE, WOLFE RS, and WOESE CR., 1977.** Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci. U S A.*, 74, 10, 4537-4541.
- FOX P.F., LAW J., MCSWEENEY P.L.H. and WALLACE J., 1993.** Biochemistry of cheese ripening. Pp. 389-438. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, volume I, General aspects, second edition. (Ed. P.F. FOX), Springer-Science+Business Media, B.V., 601p.
- FOX P.F., SNIGH T.R. and SWENEY M.C., 1994.** Proteolysis in cheese during ripening. In : *Biochemistry of milk products*. (ed. FOX P.F.) p. 1-31, The Royal Society of chemistry.
- FRANCHIN P.R., OGLIARI P.J., ANDRADE D.F., CHIAPINOTO M., LEMOS G., REBELLATTO M., DA SILVA I.G. and BATISTA C.R.V., 2006.** Comparaison of the Bax[®] System with an in- house MSRV method for the detection of salmonella in chicken carcasses and pork meat. *Brazilian J. of Microbio.*, 37, 521-526.
- FRANCO I., PREITO B., URDIALES R., FRESNO J. M. and CARBALLO J., 2001.** Study of biochemical changes during ripening of Ahmado de Aliva cheese: A Spanish tradional variety. *Food Chem.*, 74, 463-469.
- GARABAL J.I., 2007.** Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *Int . Microbiol.*, 10, 1-3.
- GASTALDI-BOUABID E., 1994.** Etude de l'évolution des micelles de caséine au cours de l'acidification : mise en évidence d'un état de transition entre pH 5.5 et pH 5.0 - Thèse Doctorat Académie de Montpellier. Université de Montpellier II.
- GATTI M., De Dea LINDNER J., De LORENTIIS A., BOTTARI B., SANTARELLI M., BERNINI V. and NEVIANI E. 2008.** Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. *Appl. Environ. Microbio.*, 74, 6, 161-171.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GIRAFFA G. and NEVIANI E., 2001.** DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. of Food Microbiol.*, 67, 19-34.
- GOBBETTI M., DE ANGELIS M., DI CAGNO R. and RIZZELL C.G., 2007.** The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. In: Improving the flavour of cheese, (Ed. B.C. Weimer), Woodhead Publishing, CRC. Pp. 121-156, 600p.
- GOROSTIZA A., CICHOSCKI A.J., VALDUGA A.T., VALDUGA E., BERNARDO A., and FRESNO J.M., 2004.** Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chem.*, 85, 407–414.
- GRAPPIN R. and COULON J.B., 1996.** Terroir, lait et fromage : éléments de réflexion. *Renc. Rech. Rum.*, 3, 21-28.
- GUIRAUD J.P. 2003.** Microbiologie alimentaire, édition DUNOD, Tec et Doc Lavoisier, Paris, 652 p.
- GUIRAUD J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. DUNOD, Paris, 652 p.
- HARATTI E., 1974.** Recherche sur le *lben* et le *klila* algériens. Thèse 3^{ème} cycle.
- HARDY J. et SCHER J., 1997.** Les propriétés physiques et organoléptiques du fromage. 1. Propriétés physiques. Pp. 479-492. In le fromage, de la science à la'assurance qualité. (Coord. A. ECK et J.C. GUILKLIS), 3^{ème} ed. Tec et Doc. Lavoisier, 891p.
- HAYALOGLU A.A., FOX P.F., GUVEN M. and CAKMAKCI S., 2007 a.** Cheeses of Turkey: Review 1. Varieties ripened in goat- skin bags. *Le Lait*, 87, 79-95.
- HAYALOGLU A.A., CAKMAKCI S., BRECHANY E. Y., DEEGAN K.C. and Mc SWEENEY P.L.H., 2007 b.** Microbiology, biochemistry, and volatile composition of tulum cheese ripened in goats skin or plastic bags. *J. of Dairy Sci.*, 90, 1102-1121.
- HAYALOGLU A.A. and KARABULUT I., 2013.** Primary and Secondary Proteolysis in Eleven Turkish Cheese Varieties. *Int. J. of Food Properties*, 16:8, 1663-1675.
- HENNQUIN D. et HARDY J., 1995.** Relations composition - texture des fromages et définition des fromages à Appellation d'Origine Contrôlée (AOC). Les IAA, n° 9, sep, p. 647-651.
- HENRI-DUBERNET S., DESMASURES N. and GUÉGHEN M., 2004.** Culture dependent and culture independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in « Camembert de Normandie » cheese. *Le Lait*, 84, 179-189.

- HORNE J., CARPINO S., TUMINELLO L., RAPISARDA T., CORALLO L. and LICITRA G., 2005.** Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. *Int. Dairy J.* 15, 605–617.
- HORNE J., CARPINO S., TUMINELLO L., RAPISARDA, T., CORALLO L. and LICITRA, G., 2005.** Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. *Int. Dairy J.*, 15, 605–617.
- IMPOCO G., CARRATO S., CACCAMO M., TUMINELLO L. and LICITRA G., 2007.** Quantitative Analysis of Cheese Microstructure using SEM Imagery; Communications to SIMAI Congress, ISSN 1827-9015, Vol. 2.
- ISO (BS EN) 4833, 2003.** Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of microorganismes- Colony-count technique at 30 degrees C.
- ISO 6611-IDF 94, 2004.** Milk and milk products- Enumeration of colony- forming units of yeasts and/or moulds- Colony-count technique at 25°C. Second edition.
- ISO 7889 IDF-117, 2003.** Yogurt-Enumeration of characteristic microorganisms- Colony-count technique at 37°C. First edition.
- KACIMI EL HASSANI S., 2013.** La Dépendance Alimentaire en Algérie: Importation de Lait en Poudre versus Production Locale, Quelle Evolution?, *Mediterranean Journal of Social Sciences*, 4 (11), 152-158.
- KONGO J.M., GOMES A.M., XAVIER MALCATA F. and MC SWEENEY P.L.H.** Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chem.*, 112, 131–138.
- JANY J.L. and BARBIER G., 2008.** Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese: review. *Food Microbiol.*, 25, 839-848.
- KALIT M.T., KALIT S. and HAVRANEK J., 2010.** An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mljekarstvo*, 60 (3), 149-155.
- KELLY A.L., O’FLAHERTY F. and FOX P.F., 2006.** Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *Int. Dairy J.*, 16, 563–572.
- KOSIKOWSKI F., 1985.** Les fromages. Revue pour la science, p. 52.
- KUNJI E.R.S., HAGTING A., DE VRIES C.J., JUILLARD V., HAANDRIKMAN A.J., POOLMAN B. and KONINGS W.N., 1995.** Transport of β -Casein-derived Peptides

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

by the Oligopeptide Transport System Is a Crucial Step in the Proteolytic Pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 270, 1569-1574.

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680- 685.

LARRÁYOZ P., ADDIS M., GAUCH R., and BOSSET J. O. 2001. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in the three European PDO ewe's milk cheeses. *Int. Dairy J.*, 11, 911–926.

LAWRENCE R. C., CREAMER L. K., and GILLES J., 1986. Texture Development During Cheese Ripening. Symposium: cheese ripening technology. *J. Dairy Sci.*, 70, 1748-1760.

LEJAOUEN J.L., 1997. Le rapport du caillé. Pp 365-374. Dans le fromage de ECK A. et GILLIS J.C. 3^{ème}Ed. Lavoisier, Tec et Doc, Paris. 875 p.

LEMOUCHI L., 2008. Le fromage traditionnel *Bouhezza*. Enquête dans la wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de deux fabrications. *Mémoire d'ingénieur* ; INATAA. Université Mentouri de Constantine. 57 p.

LENOIR J., 1962. Note sur la dégradation des protides au cours de la maturation du camembert (*). Extrait de la revue *le Lait*, mars - avril, 1963, pp. 1-11 (*) C.R. Acad. Agr., 1962, 48, 3, 160.

LEON GONGALEZ D.P., WENFORFF W.L., INGHAM B.H., JAEGGI J.J. and HOUCK K.B., 2000. Influence of salting procedure on the composition of munster type cheese. *J. Dairy Sci.*, 83, 1369-1401.

LICITRA G., L. TUMINELLO N. F., CAMPO P., LORTAL S. and CARPINO S., 2010. Wooden vat to produce P.D.O. Ragusano cheese is a living system. Abstract in *J; Dairy Sci.* Vol. 93, Suppl. 1, p 806. Editor G. W. Rogers - Knoxville - American Dairy Science Association. ADSA meeting, July 11-15, Denver, Colorado, USA.

LICITRA G., OGIER J.C., PARAYRE S., PEDILIGGIERI C., CARNEMOLLA T.M., FALENTIN H., MADEC M.N., CARPINO S. and LORTAL S., 2007. Variability of the bacterial biofilms of the “tina”wood vat used in the Ragusano cheese making process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6980–6987.

LIU S Q., HOLLAND R. and CROW V.L., 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: A review. *Int. Dairy J.*, 14, 932–945.

- LORE T.A., MBUGUA S. and WANGO K.J., 2005.** Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *LWT*, 38, 125-130.
- LORTAL S. and CHAPOT-CHARTIER M.P., 2005.** Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. Review. *Int. Dairy J.*, 15, 857-871.
- LORTAL S., BLASI A.DI., MADEC M-N., PEDILIGGIERI C., TUMINELLO L., TANGUY G., FAUQUANT J., LECUONA Y., CAMPO P., CARPINO S. and G. LICITRA., 2009.** Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *Int. J. Food Microbiol.*, 132, 1–8.
- LUQUET F.M., 1990.** Lait et produits laitiers : vache, brebis chèvre. Tome II, Tech. Et Doc., 2^{ième} édition, Lavoisier, Paris.
- FORTINA M.G., RICCI G., ACQUATI A., ZEPPA G., GANDINI A. and MANACHINI P.L. , 2003.** Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol.*, 20, 397–404.
- MALLIA, S., FERNÁNDEZ GARCÍA, E., and OLIVIER BOSSET, J. 2005.** Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *Int. Dairy J.*, 15, 741–758.
- MARCHESSEAU S., GASTALDI E., LAGAUDE A. and CUQ J.-L., 1997.** Influence of pH on Protein Interactions and Microstructure of Process Cheese. *J. Dairy Sci.*, 80, 1483–1489.
- MARCOS A., 1993.** Water Activity in Cheese in Relation to Composition, Stability and Safety. In Pp. 430-470. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology volume I, General aspects*, second edition. (Ed. P.F. FOX), Springer-Science+Business Media, B.V., 601p.
- MARIA MARINO M., BELBELDI B., LA TERRA S., MANENTI M., LICITRA G. and CARPINO S., 2012.** A survey of fat-soluble antioxidants, linolenic acid and conjugated linoleic acid content of traditional Algerian *Bouhezza* cheese. *J. of Food, Agriculture & Environ.*, 10 (3&4), 186-190.
- MARIN A.B., T.E., ACREE, J. and BARNARD., 1988.** Variation in odor detection thresholds determined by Charm analysis. *Chemical Senses.*, 13, 435–444.
- MARSHALL R.T., 1993.** Standard methods for the examination of dairy products, 16th Ed. 450p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MASSART D.L., VANDENGINSTE B.G.M., DEMING S.N., MICHOTTE Y. and KAUNFMAN L., 1988.** Principal components and factor analysis. Elsevier, Amsterdam.
- MAZARI K., BENDIMERAD N., BEKHECHI C. and FERNANDEZ X., 2010.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *J. of Medicinal Plants Research*, 4, 959–964.
- Mc SWEENEY P.L. H. , 2004;** Biochemistry of cheese ripening. Vol 57, No 2/3 , *Int. J. of Dairy Technol* , 127-144.
- Mc SWEENEY P.L.H. and SOUSA M.J., 2000** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 293–324.
- Mc SWEENEY P.L.H., OLSON N.F., FOX P.F., HEALY A. and HOJRUP P., 1993.** Proteolytic specificity of plasmin on bovine α 1-casein. *Food Biotechnol.*, 7, 143-158.
- Mc SWEENEY P.L.H., OTTOGALLI G. and FOX P.F., 2004.** Diversity of Cheese Varieties: An Overview. Pp. 1-22. In *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2 Major Cheese Groups. Third edition*, Ed. P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T M. COGAN and T.P. GUINEE. AMSTERDAM. 434p.
- MICHAELIDOU A., KATSIARI M.C., KONDYLI E., VOUTSINAS L.P. and ALICHANIDIS E., 2003.** Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *Int. Dairy J.*, 13, 179-189.
- MIELLE P. 1996.** ‘Electronic noses’: Towards the objective instrumental characterization of food aroma. *Trends in Food Sci. & Technol.*, Volume 7, numéro 12, décembre p. 432–438.
- MIETTON B., GAUCHERON F., and MICHEL S.F., 2004.** Pp 471-583. Dans *minéraux et produits laitiers* de GAUCHERON F. Ed. Lavoisier, Tec et Doc, Paris.905p.
- MOLIMARD P. and SPINLER H. E., 1996.** Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *J. of Dairy Sci.*, 79, 169–184.
- MONTEL M-A. DELBES-PAUSA C., VUITTON D.A., DESMASURES N. BERTHIER F., 2014.** Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Inter. J. of food microbiol.* 177, 136–154.
- MUCCHETTI G., GHIGLIETTI R., LOCCI F., FRANCOLINO S., BONVINI B., REMAGNI M.C., ZAGO M., IEZZI R. and CARMINATI D., 2009.** Technological,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

microbiological and chemical characteristics of pannerone, a traditional Italian raw milk cheese. *Dairy Sci. Technol.*, 89, 419-436.

MULTON J.L., 1991 Technique d'analyse et de contrôle dans les industrie agro – alimentaires –volume 4 analyse des constituants alimentaires p, 281-282.

MULVIHILL D.M. and FOX P.F., 1979. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *J. Dairy Res.*46, 641-651.

MUYZER G. and SMALLA K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van leeuwenhoek*, 73, 127-141.

NIMER T., 2006. Caractérisations physico-chimiques du fromage traditionnel Algérien *Bouhezza* de ferme et de commerce (wilayas de Batna et Oum El Bouaghi, 2006). *Mémoire d'ingénieur*, INATAA, Université Mentouri Constantine, 60p.

O'KEEFFE A.M., FOX P.F. and DALY C., 1978. Proteolysis. Role of coagulant and starter bacteria. *J. Dairy Research*, 45, 465-477.

O'KEEFFE A.M., FOX P.F., and DALY C., 1978. Proteolysis. Role of coagulant and starter bacteria. *J. Dairy Research*, 45, 465-477.

OGIER J-C., LAFARGE V., GIRARD V., RAULT A., MALADEN V., GRUSS A., LEVEAU J-Y. and DELACROIX-BUCHET A., 2004. Molecular Fingerprinting of Dairy Microbial Ecosystems by Use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5628–5643.

OLSON, N. F. 2008. Cheese, in *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*, Volume 9, Second Edition (eds H.-J. REHM and G. REED), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527620920.ch9.

ONG L. DAGASTINE R.R., KENTISH E.S. and GRAS S.L., 2011. Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1291-1302.

PANSERI S., GIANI I., MENTASTI T., BELLAGAMBA F., CAPRINO S. and MORETTI V. M., 2008 Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography–mass spectrometry. *LWT: Food Sci. and Technol.* 41 (2) 185–192.

PAPPA E.C., KANDARAKIS I.G., ZERFIRIDIS G.K., ANIFANTAKIS E.M. and SOTIRAKOGLU K., 2006. Influence of starter cultures on the proteolysis of Teleme cheese made from different types of milk. *Le Lait*. 86 : 273-290.

- PARAYRE S., FALENTIN H., MADEC M.N., SIVIERI K., LE DIZES A.S., SOHIER D., and LORTAL S., 2007.** Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *J. Microbiol. Methods* 69: 431–441.
- PEREIRA C.I., GOMES A.M.P. and MALCATA F.X., 2009.** Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 20,213-219.
- PEREZ PACHECO F. and BUCIO GALINDO A., 2010.** Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth. In current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas (Ed.) 1205-1216.
- PILET M.F., MAGRAS C. et FEDERIGHI M., 1998.** Bactéries lactiques, pp 244-257. In Manuel de bactériologie alimentaire (Coord. SURTA L., FEDERIGHI M. et JOUVE J.L.) Ed. polytechnique, Paris.308p.
- PONCE DE LEON-GONZALEZ L., WENDORFF W. L., INGHAM B. H., JAEGGI J. J. and HOUCK K. B., 2000.** Influence of Salting Procedure on the Composition of Muenster-Type Cheese . *J Dairy Sci* 83:1396–1401.
- POVEDA J. M., SÁNCHEZ-PALOMO E., PÉREZ-COELLO M. S. and CABEZAS L., 2008.** Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Sci. Technol.* 88, 355–367.
- RACHEF R., 2006.** Caractérisation microbiologique du fromage traditionnel Algérien « *Bouhezza* » de ferme et de commerce (wilaya de Batna et Oum El Bouaghi). *Mémoire d'ingénieur*, INATAA, Université Mentouri de Constantine. 58p.
- RAMET J.P., 1985.** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéens. Ed. Etude FAO. Production et santé animale, 187 P.
- RAMET J.P., 1987.** La préparation du caillée, 1- : La présure et les enzymes coagulantes. Dans Le fromage (Coord. ECK A.), Tec et Doc. Lavoisier, pp 101-107, 539 p.
- RAMET J.P., 1997.** L'égouttage du coagulum. Dans Le fromage (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.). 3^{ème} édition, Ed. Tec et Doc. Lavoisier. p. 43.
- RAMET J.P., 1997.** La préparation du caillée, 1- : La présure et les enzymes coagulantes (p. 101-107). Dans Le fromage (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.) , 3^{ème} ed. Tec et Doc. Lavoisier.

- RANDAZZO C.L., TORRIANI S., AKKERMANS A.D., DE VOS W.M. and VAUGHAN E.E., 2002.** Diversity dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and environmental Microbiol.*, 68, 1882-1892.
- RANDAZZO L., VANGHAN E.E. and CAGGIA C., 2006.** Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *Int. J. Food microbial.* 109, 1-8.
- RAPISARDA T., PASTA C., BELVEDERE G., SCHADT I., LA TERRA F., LICITRA G. and CARPINO S., 2013** Variability of volatile profiles in milk from the PDO Ragusano cheese production zone. *Dairy Sci. & Technol.* doi:10.1007/s13594-012-0104-3.
- REHMAN S-UR and FOX P.E., 2002.** Effect of added of *o*-ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. *Food Chem.* 76, 21-26.
- RICHARD H. et MULTON J.L., 1992.** Les arômes alimentaires, p.287-378, Tec et Doc Lavoisier, APRIA, 438p. (Sciences et techniques Agroalimentaires).
- ROUDOT A-C., 2002.** Rhéologie et analyse de texture des aliments. Edition, Tec et Doc., 197p.
- ROVIRA S., LÓPEZ M.B., FERRANDINI E. and LAENCINA J., 2011.** Hot topic: microstructure quantification by scanning electron microscopy and image analysis of goat cheese curd. *J. Dairy Sci.* 94, 1091–1097.
- SAMET-BALI O., ENNOURI M., DHOUB A. and ATTIA H., 2012.** Characterisation of typical Tunisian fermented milk: Leben. *African J. of Microbiol. Research*, 6 (9), 2169-2175.
- SAMET-BALLI O., BELLILA A., AYADI M-A., MARZOK B. and ATTIA H. (2010).** A comparison of the physicochemical, microbiological and aromatic composition of Traditional and Industrial Leben in Tunisia. *Int. J. of Dairy Technol.*, 63 (1), 98-104.
- SAOUDI Z., 2012.** Caractérisation microbiologique de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « Bouhezza » de ferme. *Thèse de magistère.* INATAA. Université Mentouri Constantine. 90p.
- SARANTINOPOULOS R., KALANTZOPOULOS G. and TSAKALIDOU E., 2002.** Effect of *Enterococcus faecium* microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 93-105.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- SAVIJOKI K., INGMER H. and VARMANEN P., 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 394–406.
- SCHMIDT D.G., 1982.** Association of caseins and casein micelle structure. In developments in dairy chemistry - 1- Proteins (Coord. FOX P.F.) A.S.Publishers, pp. 61-86, 410 p.
- SCHULZ-COLLINS D. and SENGE B. 2004.** Acid- and Acid/Rennet-curd Cheeses Part A: Quark, Cream Cheese and Related Varieties 301-328. In In Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2 Major Cheese Groups. Third edition, Ed. P.F. FOX, P.L.H. MCSWEENEY, T M. COGAN and T.P. GUINEE. AMSTERDAM. 434p.
- SENOUSSI A., 2013.** Caractérisation microbiologique de la peau de chèvre utilisée dans la fabrication d'un fromage traditionnel Algérien « *Bouhezza* ». 90p.
- SERHAN M., CAILLIEZ-GRIMAL C., BORGES F., REVOL-JUNELLES A.M., HOSRI C. and JACQUES FANNI J., 2009.** Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.*, 26, 645–652.
- SERHAN, M., LINDER, M., HOSRI, C. and FANNIA, J., 2010.** Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Research*, 90, 75–82.
- SETTANNI L. and MOSCHETTI G., 2010.** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.*, 27, 691-697.
- SINGH, T. K., DRAKE, M. A., and CALDWALLADER, K. R. 2003.** Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*, 2, 139–162.
- SMIT G., SMIT B.A. and ENGELS W.J.M., 2005.** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 591–610.
- SOLÍS-MÉNDEZ A. D., ESTRADA-FLORES J. G. and CASTELÁN-ORTEGA O. A., 2013.** A study on the texture diversity of the Artisan Ranchero Cheese from Central Mexico., *Int. J. of Dairy Technol.*, 66, 1, 37-44.
- SOUSA M.J. and MALCATA F.X., 1997.** Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 205, 97–103.
- SPINLER H.E, GHICHARD E. et GRIPON J-C., 1997.** Les propriétés physiques et organoléptiques du fromage. 2. La flaveur des fromages. Pp. 493-508. In le fromage, de la

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- science à l'assurance qualité. (Coord. A. ECK et J.C. GUILKLIS), 3^{ème} ed. Tec et Doc. Lavoisier, 891p.
- UNI ISO 21528-2, 2010.** Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of enterobacteriaceae. Part 2 : Colony-count method.
- URBACH G., 1993** Relations between cheese flavour and chemical composition. *Int. Dairy J.*, 3, 389–422.
- VARMING C., PETERSEN M.A., SKOV T. and ARDÖ Y., 2013.** Challenges in quantitative analysis of aroma compounds in cheeses with different fat content and maturity level. *Int. Dairy J.*, 29, 15-20.
- WATANABE K, FUJIMOTO J, TOMII Y, SASAMOTO M, MAKINO H, KUDO Y, OKADA S. , 2009.** *Lactobacillus kisonensis sp. nov.*, *Lactobacillus otakiensis sp. nov.*, *Lactobacillus rapi sp. nov.* and *Lactobacillus sunkii sp. nov.*, heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59 (Pt 4), 754-760.
- WEBER F, 1987.** L'égouttage du coagulum. Dans le fromage (coord. ECK A), 2^{ème} édition. p122.
- WIDYASTUTI Y., ROHMATUSSOLIHA T. and FEBRISANTOSA A., 2014.** The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation; *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5, 435-442.
- WOUTERS J. T. M., AYAD E. H. E., HUGENHOLTZ J. and SMIT G. 2002.** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, 12, 91-109.
- ZAIDI O., ZERTAL M. et ZIDOUN M.N., 2000.** Présentation d'un fromage traditionnel *Bouhezza*. *J.A.M.*, n° 02 vol X, mars-avril, pp 96-101.
- ZEPPA G., GIORDANO M., GERBI V., and ARLORIO M., 2003.** Fatty acid composition of Piedmont "Ossolano" cheese. *Le Lait*, 83, 167–173.

ANNEXES

ANNEXE I :

Questionnaire/fiche technique des variétés de fromages (FOX, 1993)

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1 Type de lait | 14 Saveur |
| vache, de chèvre, | Saveur : |
| de mouton, bison | doux |
| cru ou pasteurisé | net |
| 2 Type de ferment (Starter) | piquant |
| <i>Lactococcus lactis ssp. Lactis</i> | 15. intérieur : |
| <i>L. lac tis ssp. Cremoris</i> | grands yeux |
| <i>L. lactis ssp. Diacetylactis</i> | petits yeux |
| <i>Str. Thermophilus</i> | ouvertures irrégulières |
| <i>Lactobacillus</i> (espèces) | texture fermé |
| autres | |
| Défini, non défini, «Naturel» | |
| 3. Coagulant | 16. microflore secondaire |
| présure (type) | Propionibacteria |
| acide | La moisissure bleue |
| mixte (acidification/chauffage) | La moisissure blanche |
| 4. Température de réglage | Frottis de surface |
| 5. Température de cuisson | croûte sèche |
| 6. pH à l'égouttage du lactosérum | autres |
| 7. Caillé pressé | 17. Indices de maturité |
| 8. Salage : | (valeurs typiques pour les fromages affinés) |
| en masse (avec le caillé) | pH |
| saumurage de surface | NT soluble dans l'eau ou à pH 4, 6 (en %) |
| à sec | NT soluble dans TCA 12 (en %) |
| 9. Caillé étiré Oui | NT soluble dans PTA (en%) |
| (pâte filée) Non | azote total d'acides aminés libres (en %) |
| 10 Composition,% | caséine α totalement hydrolysée |
| matières grasses | caséine β totalement hydrolysée |
| humidité | Acides gras libres, (mEq / kg) |
| graisse de la matière sèche | L'acide lactique (%) |
| protéine | Isomère de l'acide lactique (D, L) |
| sel | Est-ce que l'acide lactique subit changement ? |
| 11 pH | 18. Apparence physique : |
| 1 jour | forme |
| Mature | poids (kg) |
| 12 Consistance | hauteur |
| dur | diamètre |
| semi-dur | 19. Volume de production (tonnes / an) |
| semi doux | 20. Est-ce que le fromage a une appellation d'Origine |
| doux | Protégée. ? |
| 13 Affinage : | 21. Synonymes : des variétés apparentées |
| Durée, mois | (utiliser une page supplémentaire si nécessaire) |
| température | 22 Toute autres informations pertinentes (utiliser une page |
| humidité | supplémentaire si nécessaire) |

NT : azote total ; PTA : acide phosphotungstique TCA : acide trichloroacétique

Annexe II
Questionnaire sur le fromage *Bouhezza*

Nom et Prenom _____ Age _____
Adresse _____ Commune _____ Wilaya _____

I. Préparation de la *chekoua* pour la fabrication de *Bouhezza*

Choix de la peau : d'agneau de chèvre de brebis de chevreau

I.1. Dépilage de la peau

- Comment est fait le dépilage de la peau ?

- La peau est abandonnée jusqu'à putréfaction (1)
 Lavage de la peau avec du savon Marseille puis laissée jusqu'à putréfaction (2)
 Autres à préciser (3)

Durée de putréfaction en jour (j)

Quelle est la meilleure méthode ? 1 2 3

Pourquoi ? rapide moindre odeur de putréfaction moindre coût

I.2. Lavage de la peau

I.3. Traitement de la peau

Préciser le type de matières et la quantité utiliser pour le traitement de la peau

Matières	X	Quantité	Durée de traitement
Sel			
<i>Arar</i> (genièvre)			
<i>Lben</i>			
Semoule			
Tanin			
Autres			

Comment vous utilisez ces produits (en macération ou poudre) ?.....

Est-ce que cette opération est répétée et pourquoi ?

I.4. Lavage de la peau

I.5. Retournement de la peau (coté poils à l'intérieure)

I. 6. Nouaison de la peau

- Est-ce que vous pouvez conserver la peau ? oui non

- Si oui comment se fait cette conservation (avant ou après nouaison, par déshydratation, ...)

.....

...

- Quelles sont les produits utilisés pour la conservation de la peau ?.....

- Quelles sont les conditions de conservation de la peau ?.....

- Au moment de l'utilisation, la peau trempée dans l'eau ou *Lben*

Sur une période de _____ jour (s)

Préciser la quantité de *Lben* utilisée

.....

- Volume finale de la *chekoua* 5 l 6-10 l 10-15 l plus de 20 l

II. Fabrication de *Bouhezza*

II.1. Matière première et préparation du *Lben*

Quel type de lait vous utilisas pour la fabrication de *Bouhezza* ?

Lait de vache lait de brebis lait de chèvre lait de mélange

Lben de vache *Lben* de brebis *Lben* de chèvre

- le lait est abandonné dans un endroit (frais, tiède, chaud)..... durant..... j (s)

- est-ce que la crème est récupérée ? Entièrement partiellement

- barattage du lait obtenu "*raib*"

- mouillage du lait baratté

- est-ce que le beurre obtenu est récupéré, et pourquoi ? Entièrement

partiellement

- Le *Lben* ainsi obtenu est utilisé directement oui non

- Le *Lben* utilisé dans la fabrication est de préférence

peu acide très acide quelque soit son acidité Pourquoi ?.....

II.2. Préparation du fromage

- La première quantité de matière première mise dans la *chekoua* remplit tout son volume

la 1/2 de son volume le 1/3 de son volume le 1/4 de son volume pas important

-Les ajouts successifs de la matière première se font selon :

la vitesse d'égouttage la disponibilité de lait la durée d'égouttage autres

- Le sel est mis dans le *Lben* la *chekoua*

- Le goût du *Lben* est : trop salé peu salé moyennement salé

- Préciser la quantité de sel (cuillère à soupe/l de matière première)

- La *chekoua* est ensuite suspendue dans un endroit :

frais froid à l'ombre à l'air toujours dans le même endroit

- Comment se fait le nettoyage du côté extérieur de la *chekoua* et avec quoi ?

.....

.....

- Est-ce que la *chekoua* est lavée après chaque ajout chaque jour chaque 02 j

- Si la *chekoua* est mal entretenue, quelles sont les conséquences ?

II.3. Période de fabrication

- Préciser la période de fabrication du fromage *Bouhezza* (mois de départ et de fin) :

J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

- Est-ce que le fromage est consommé pendant la période de fabrication ? oui

non

- Si oui préciser à partir de quel moment (en semaine ou en mois).....

- Si non pourquoi ?.....

- La période de fabrication est limitée selon :

la disponibilité de lait la volonté de fabrication la maturation du fromage

- Préciser à partir de quel moment de la fabrication vous ajoutez du lait cru et pourquoi ?

.....

.....

- Préciser les produits utilisés pour l'assaisonnement du fromage (piment rouge piquant et/ou autres

épices).....

- Est-ce que l'ajout du piment rouge piquant améliore la durée de conservation du fromage ?...

II.4. Conservation du fromage

- Le fromage se conserve dans un récipient en :

Verre céramique plastique *chekoua* autres

- La conservation se fait avec le froid sans le froid

- Préciser la durée de conservation

J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

- Quelles sont les altérations du fromage *Bouhezza* ?

Goût : acide levure rance autres

Aspect et texture : couleur onctueux granules fondue croûte

Odeur : levure rance putréfaction

- Quels sont les facteurs de détérioration :

Manque d'hygiène putréfaction de la peau présence de mouches autres

II.5. Mode de consommation

- le fromage se consomme sous forme de pâte poudre déshydratée autres

- le fromage se consomme Sous forme de tartine sur galette et pains

Assaisonne la sauce des plats traditionnels comme couscous, aiche, M'kartfa

autres à préciser

ANNEXE III

Détection des bactéries pathogène par le système BAX[®]1. Détection de *Salmonella* (validé par AFNOR)

a- Pré-enrichissement et enrichissement

Une quantité de 25mL d'échantillon de lait et/ou de *Lben* est mise dans 225mL d'eau peptonée tamponnée (Oxoid, CM0509), supplémentée en novobiocine à 20mg/L (Oxoid, SR0181E) sont ajoutés et homogénéisés. Le bouillon obtenu est incubé pendant 20-24 heures à 42°C. L'écouvillon utilisé dans le biofilm de la peau de chèvre a été prélevé, est mis dans 10mL de milieu de pré-enrichissement (eau peptonée supplémentée en novobiocine à 20mg/L), l'ensemble est incubé dans les même conditions. Après le pré-enrichissement, un volume de 10 µL de bouillon obtenu (lait, *Lben* et biofilm) est alors transféré dans un tube Eppendorf contenant 500µL de bouillon cœur-cerveille (Oxoid, CM0225) pour une deuxième incubation pendant 3 heures à 37°C, pour assurer un enrichissement en *Salmonella*.

b- Lyse des cellules et libération de L'ADN

Etiqueter et arranger le nombre de tubes Eppendorf à utiliser (un tube pour chaque échantillon et un tube pour l'essai à blanc). Pour la préparation du réactif de lyse, 150µL de protéase ont été additionnés à 12mL de tampon de lyse (kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Salmonella*, Oxoid QB0608C) sans oublier d'étiqueter la boîte avec la date de préparation.

Remarques : le réactif de lyse restera utilisable deux semaines au maximum s'il est stocké à 2-8°C. Nous pouvons préparer des petits volumes de réactif de lyse selon le besoin, en maintenant le rapport à 12,5µl protéase pour 1mL du tampon de lyse.

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

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

Après la lyse, les tubes Eppendorf avec leur lysat sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5 min (2-8°C), le temps de préparer le transfert de lysat aux tubes PCR.

c- Amplification et détection

Un volume de 50µl de lysat est transféré dans un tube PCR contenant un comprimé des réactifs nécessaires à la PCR et à la réaction de fluorescence (Kit d'analyse de système

BAX[®] automatisé pour *Salmonella*, Oxoid QB0608C). Après amplification le marqueur lié aux fragments d'ADN amplifié génère un signal fluorescent, qui est automatiquement détecté et analysé par le logiciel BAX[®] System Q7 (la détection se fait de la même manière pour les trois pathogènes).

2. Détection de *Listeria monocytogenes* (AOAC 2003, 12 cité dans AOAC, 2010)

a-Pré-enrichissement et enrichissement

Un volume de 25 mL d'échantillon de lait et/ou de *Lben* est ajouté à 225mL de bouillon de tryptone soja et extrait de levure (LEEB, Oxoid CM0862), puis incubé pendant 22-24 heures à 30°C, afin de permettre le pré-enrichissement. L'écouvillon du biofilm de la peau est pré-enrichie dans le même milieu de pré-enrichissement et incubé dans les mêmes conditions. Après incubation, un volume de 0,1mL du bouillon de pré-enrichissement de chaque échantillon de lait, *Lben* et biofilm est transféré dans 9,9mL du milieu MOPS-BLEB (Oxoid, CM1071B), et incubé pendant 18-24heures à 35°C, afin de réaliser l'enrichissement.

b- Lyse des cellules et libération de L'ADN

Un volume de 5µl de bouillon enrichi est ajouté à 200µL de réactif de lyse (Kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Listeria monocytogenes*, Oxoid QB069C) dans un tube Eppendorf, pour effectuer deux incubations :

- une première incubation pendant 60min à 55°C pour la dégradation des protéines cellulaires ;
- une deuxième incubation pendant 10min à 95°C pour l'inactivation de la protéase.

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

C- Amplification et détection

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

3. Détection de l'*Escherichia coli* O157 : H7

a-Enrichissement :

Un volume de 25mL de lait et/ou de *Lben* est additionné à 225mL de bouillon tryptone soja modifié (Oxoid CM0989) supplémentée en novobiocine à 10mg/L (Oxoid SR0181E),

l'ensemble est incubé pendant 18-24 heures à 42°C. L'écouvillon du biofilm de chaque peau est enrichie dans le même milieu (10mL) et incubé dans les mêmes conditions.

b-Lyse des cellules et libération de L'ADN

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

- une première incubation pendant 20 min à 37°C ;
- une deuxième incubation pendant 10 min à 95°C ;

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

c-Amplification et détection

Un volume de 50µL de lysat est transféré dans un tube PCR contenant (sous forme de comprimé) tous les réactifs nécessaires à la PCR, et à la réaction de fluorescence (Kit pour analyse de système BAX[®] automatisé pour *Escherichia coli*O157:H7, Oxoid QB0611C).

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

4. Expression des résultats

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

ANNEXE IV

Etapes détaillées de l'extraction de l'ADN à partir du fromage

10 g de fromage + 90 mL de citrate trisodique à 2 % chauffé à 40-50 °C



Homogénéisation dans un stomacher pendant 5 à 10 min



Prélèvement de 1 mL de la solution citratée dans un ependroff

Centrifugation à 4000 rpm pendant 20 sec

Eliminer le surnageant et ajouter au culot le tampon de lyse (400 µl), le lysozyme et la mutanolysine

Incubation à 37°C /1 heure



Ajouter 50 µL de protéinase K (solution de 20mg / mL) et 200 µL

Incubation à 70°C pendant 30min



Ajouter au mélange 200 µL d'éthanol absolu (à 4°C pour précipiter l'ADN) et incubés pendant 5 minutes à température ambiante



Déposer le mélange obtenu dans une colonne d'extraction d'ADN et centrifuger à 10000 rpm (centrifugeuse 5415 R) pendant 2 minutes à 20°C

Placer la colonne d'extraction sur un nouveau tube collecteur de 2 mL



Ajouter 500 µL du tampon AW1, centrifuger à 10 000 rpm pendant 2 min à 20°C



Replacer la colonne d'extraction sur un autre tube collecteur de 2 mL

Ajouter 500 µL du tampon AW2, centrifuger à 13 000 rpm pendant 3 min à 20°C



Placer la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 mL



Eluer en déposant 200 µL du tampon AE, incubé 2 min à température ambiante,

Centrifuger à 10000 rpm pendant 2 min à 20°C (Première élution)

Transférer la colonne dans un autre tube Eppendorf et ajouter 200 µL de tampon AE, le tube est centrifugé à 10000rpm pendant 2 min à 20°C (Deuxième élution)

Conservation à 20°C jusqu'à utilisation

Vérification de la pureté et de la concentration de l'ADN extrait par spectrophotométrie dans un nano drop
 Rq 1: pour 1 mL de tampon de lyse (20mM de tris HCL [pH=8], 2mM EDTA, 1,2% Triton X-100) en ajoute 20 mg de lysozyme et 10 µl de mutanolysine (solution à une concentration de 5 U/µl, conservé à -20°C) ; Tampon AL (DNeasy tissu kit QIAGEN, France), le kit DNeasy® tissu contient les tampons : de lyse, protéinase K, AW1, AW2, AE, AL, et la colonne d'extraction).

Rq 2 L'extraction de L'ADN génomique à partir du lait, *Lben* et du biofilm de la peau de chèvre a été effectuée selon le protocole proposé par LICITRA *et al.* (2007). Un volume de 10 mL du lait (ou de *Lben*) et un volume de 5mL de biofilm sont mis dans des Eppendorf de 2 mL et centrifugés à 4000 rpm pendant 20min puis nous ajoutons le tampon de lyse.

La purification de l'ADN est effectuée selon les instructions de Kit (DNeasy tissu kit). Après centrifugation, la sont ajoutés et centrifugés à 10000 rpm pendant 2min à 20°C. La colonne est transférée dans un nouveau tube de collecte de 2 mL et 500µL de tampon AW2 sont ajoutés et centrifugés à 13000 rpm pendant 3min à 20°C.

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

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

ANNEXE V

Analyse des descripteurs sensoriels d'un fromage

Nom/ Prénom :

date :

Un échantillon de fromage vous est proposé. Il vous est demandé d'évaluer ses caractéristiques.

L'ordre d'évaluation est le suivant :

1• Aspect et texture, 2• Odeur/Arôme, 3• Goût et 4 consistance de la pâte

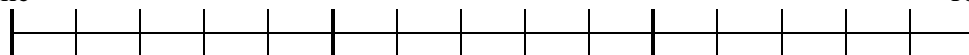
1-ASPECT ET TEXTURE

Donnez une note sur l'échelle suivante pour la consistance de la pâte

Couleur

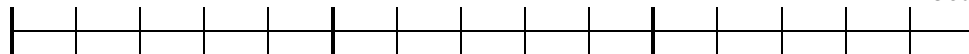
blanc

rouge

**Tartinabilité**

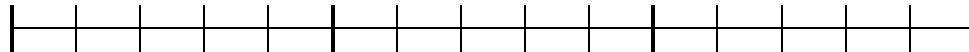
néant

beaucoup

**Rugueux**

néant

beaucoup

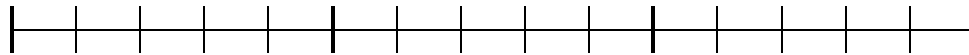
**2- ODEUR/AROME**

Flairez et notez rapidement sur l'échelle l'intensité de l'odeur du fromage

Rancidité

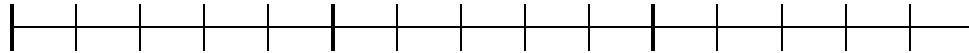
néant

beaucoup

**Levure**

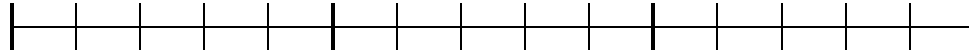
néant

beaucoup

**Odeur Animale**

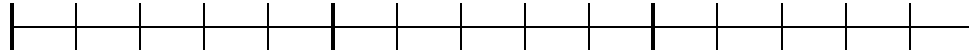
néant

beaucoup

**Herbe**

néant

beaucoup

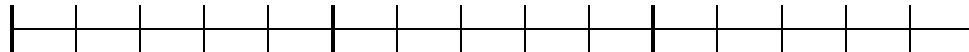
**3-GOUT**

Mastiquez l'échantillon de fromage puis évaluez les saveurs sur l'échelle suivante :

Acide

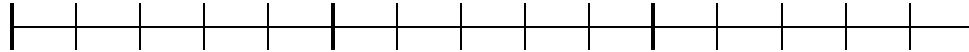
néant

beaucoup

**Salé**

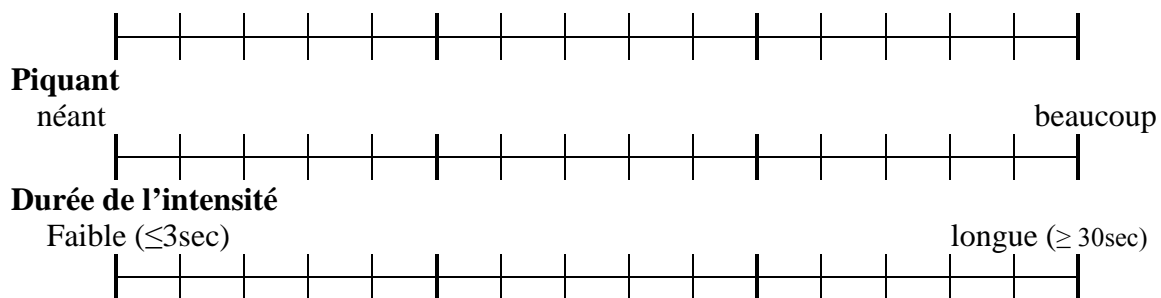
néant

beaucoup

**Astringent**

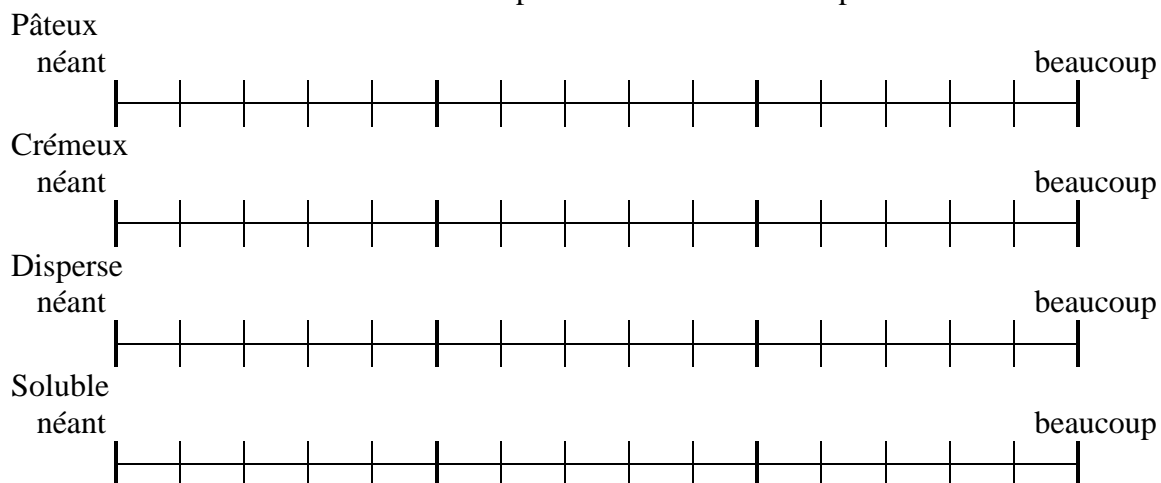
néant

beaucoup



4-CONSISTANCE

Donnez une note sur l'échelle suivante pour la consistance de la pâte



ANNEXE VI

Caractéristiques biochimiques des bacilles (a) et des coques (b) lactiques du fromage *Bouhezza*

Tests Souches	Croissance à			Lactose	Mannitol	saccharose	maltose	dextrine	fructose	glucose	Fermentation
	10°C	15°C	45°C								
L ₁	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₂	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	Hété
L ₃	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₄	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Homo
L ₅	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₆	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Homo
L ₇	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	Hété
L ₈	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₉	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₁₀	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₁₁	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Homo
L ₁₂	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₁₃	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	Hété
L ₁₄	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Homo
L ₁₅	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₁₆	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	Homo
L ₁₇	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Homo
L ₁₈	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	Homo
L ₁₉	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	Homo
L ₂₀	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	Hété

(b)

Tests Souche	Croissance à					Ther	Lact	Glu	Sacch	Mani	Malt	Fru	Dext	Citr	β-galacto	Fermen
	10°C	45°C	pH 9,6	4% NaCl	6,5%NaCl											
S1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	Homo
S2	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	homo
S3	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	homo
S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	homo
S5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	homo
S6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	homo
S7	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	homo
S8	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	homo
S9	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	homo
S10	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	homo
S11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	homo
S12	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	homo
S13	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	homo
S14	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	homo
S15	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	homo
S16	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	homo
S17	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	homo
S18	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	homo
S19	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	homo
S20	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	homo

Ther : thermorésistance ; glu : glucose ; sacch : saccharose ; manit : mannitol ; mal : maltose ; fruct : fructose ;
dext : dextrin ; ctr : citrate ; β-galacto : β-galactosidase ; ferment : fermentation

ANNEXE VII

Composants volatiles dans le fromage Bouhezza par P&T-GC/MS/O.

Composant	Classe chimique	Descripteur	LRI a	Identb	F1	F2	F3	F4
acide butyrique	acide	sueur	818	PI		*		
acide acétique	acide	aigre/ail	815	MS,PI				
nonadienol	alcool	herbe	1167	PI	*	*	*	*
1-butanol, 3-méthyl	alcool	ail rance	838	MS,PI	*			
octanal	aldéhyde	orange,citron	1030	MS,PI	*		*	*
nonanal	aldéhyde	lait	1121	MS,PI	*	*	*	*
heptanal	aldéhyde	désagréable	946	MS,PI			*	*
4-heptenal	aldéhyde	fromagege rance	917	PI				
2-hexenal	aldéhyde	pomme	852	PI				
(Z)-2-nonenal	aldéhyde	foin	1181	PI	*	*	*	*
(E,E)-2,4-decadienal	aldéhyde	huile de friture	1236	PI	*		*	*
(E)-2-nonenal	aldéhyde	herbe	1175	PI	*	*	*	*
methional	aldéhyde	pomme de terre cuite	954	PI			*	
acide octanoïque ester	ester	vin	1214	MS,PI	*	*	*	*
géranate méthyl	ester	floral	1294	PI			*	
acide hexanoïque ester	ester	pomme,orange	1028	MS,PI	*	*	*	*
valérate d'éthyl	ester	pomme	911	PI	*			
acide butanoïque ester	ester	apple up	877	MS,PI	*	*	*	*
acide acétique 1-meth	ester	pomme	850	MS	*		*	
1-butanol, 3-méthyl ac	ester	pomme ,abricot	929	MS	*			
3,5-octadiénone	cétone	champignons comestibles	1101	PI	*	*	*	*
1-octen-3-one	cétone	mushroom up	1008	PI	*	*	*	*
diéthyl méthyl pyrazine	pyrazine	brulé	1118	PI	*	*	*	*
azine	pyridine	piquent	830	PI		*		
thiophane	sulfure	Ail rance	799	PI	*	*	*	*
isodihydro carvéol	terpène	poivre rouge	1202	PI				
géraniol	terpène	vin, floral	1278	PI	*		*	*
(+)-cis-rose-oxyde	terpène	floral,orange	1126	PI	*			
TOTAL					19	13	18	15

a LRI, Linear Retention Index, HP-5 capillary column. b Identification: MS (Wiley library); PI (Internet Data Base: flavomet)
NI: non identifié

F1 et F2 : Bouhezza de ferme affinés à 75j

F3 et F4 : Bouhezza de ferme affinés à 150j

Productions scientifiques

Articles avec comité de lecture

1 - **Aissaoui Zitoun, O.**, Benatallah, L., El H. Ghennam, & Zidoune, M.N. (2011). Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened *Bouhezza* cheese. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9, 96–100.

2- **Aissaoui Zitoun, O.**, Pediliggieri, C., Benatallah, L., Lortal, S., Licitra, G., Zidoune M.N. (2012). *Bouhezza*, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. Journal of Food, Agriculture & Environment, 10 (2), 289-295.

Articles rédigés

Aissaoui Zitoun, O., T. Rapisarda, G. Belvedere, H. Medjoudj, G. Licitra, M.N. Zidoune Use of Smart Nose and GC/MS/O analysis to define volatile fingerprint of a goatskin bag cheese “*Bouhezza*”.

Aissaoui Zitoun O., Carpino S., Fucà N., Pediliggieri C., Tuminello L., Licitra G., Zidoune M.N. Ecosystem characterization of goatskin bag “*Chekoua*” for use in traditional manufacturing and ripening of “*Bouhezza*” Algerian cheese.

Communications internationales

Aissaoui Zitoun O., A. Senoussi, F. Adoui et M. N. Zidoune. Fromage traditionnel *Bouhezza*: Identification biochimique de la flore lactique (P30). 1st INTERNATIONAL MEETING ON : Milk vector of development, Rennes, France , 21 -23 Mai, 2014.

Aissaoui Zitoun O., L. Benatallah, H. Boughellout, H. Attia et M. N. Zidoune. Fromage traditionnel *Bouhezza* : Etude des caractéristiques rhéologiques et texturales au cours de la fabrication (P31). 1st INTERNATIONAL MEETING ON : Milk vector of development, Rennes, France , 21 -23 Mai, 2014.

Aissaoui Zitoun O., S. Carpino, T. Rapisarda, G. Belvedere, H. Medjoudj, G. Licitra, M.N. Zidoune. Fromage traditionnel *Bouhezza* : Etude du profil aromatique au cours de la fabrication (P32). 1st INTERNATIONAL MEETING ON : Milk vector of development, Rennes, France , 21 -23 Mai, 2014.

Aissaoui Zitoun O., Fucà N., Pediliggieri C., Tuminello L., Zidoune M.N., Licitra G., Carpino S. Ecosystem characterization of “goatskin” biofilm, IDF International Symposium on Sheep, Goat & other non-Cow Milk, Athens, Greece, 16-18 May 2011.

Aissaoui Zitoun O., Attia H. et Zidoune M. N. Le fromage traditionnel algérien *Bouhezza* : Présentation et caractérisation. Congrès international sur les technologies alimentaires. Haleb, Syrie (communication oral), Novembre 2008.

Aissaoui Zitoun O. et Zidoune M. N. Le fromage traditionnel algérien "*Bouhezza*". Séminaire d'Animation Régional ' Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments 'INSAT – Tunis (communication orale), Tunisie, 27 – 28 – 29 novembre, 2006, Actes des sommaires. pp 118-124.

Communications nationales

Aissaoui Zitoun O. et Zidoune M. N. Le fromage traditionnel Algérien *Bouhezza* "terroir et fabrication " Séminaire de Nutrition et Technologies alimentaires. Communication orale. Séminaire du 12-13 Novembre 2007. INATAA, Constantine.

O. Aissaoui Zitoun, C. Pediliggieri, S. Lortal, S. Carpino, G. Licitra, et M.N. Zidoune. Bactéries lactiques originaires du fromage traditionnel *Bouhezza* : Evolution et caractérisation par PCR-TTGE. The Second International Conference on Biotechnology "Biotech World 2010: Startups & Biotechnology. Communication orale. 26 – 29 April 2010, Oran.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الى تحديد خصائص الجبن التقليدي الجزائري " بوهزة " من خلال التحقيق في منطقة الشاوية بشرق الجزائر مع القيام بصنع الجبن بوهزة مخبريا .
سمح التحقيق الميداني بالترسيم الجغرافي لمنطقة صنع جبن " بوهزة " و جمع كافة المعلومات المتعلقة بالكيفية التقليدية لصناعته بعد استجواب 289 اسرة تعرف و تصنع جبن بوهزة ضمن 841 اسرة . النتائج اثبتت ان اصل ممارسة هذا التصنيع يعود لمنطقة الشاوية الممتدة على عدة ولايات الوطن (في ولاية ام البواقي . ولاية باتنة ولاية خنشلة وولاية تبسة) وصولا الى الحدود التونسية . من جهة اخرى قمنا بتحديد مخطط صناعة جبن بوهزة الاكثر انتشارا و تواجدا.

خصائص العينات التي تم جمعها من المزارع (22 عينة مع فترة نضج من 30 إلى 150 يوم) و المتحصل عليها مخبريا اظهرت تقارب بينهم في الخصائص الميكروبيولوجية (مجموع البكتيريات اللبنية و الخمار والعفن و البكتيريات المسببة للأمراض) و الخصائص الفيزيائية (درجة الحموضة، الحموضة، والملوحة). مجموع البكتيريات الساندة العقديات والعصيات اللبنية. اظهرت النتائج أن محتوى المستخلص الجاف الاجمالي للجبن " بوهزة و محتوى الدهون يعتمد على مدة نضج الجبن، والجبن الجديد يحتوي على ما يقرب من 20-25% من المستخلص الجاف و ،الجبن الذي نضج 2 أشهر بنسبة 30-35%. يتراوح محتوى الدهون 21-39 غ / 100 غ. من ناحية أخرى، الحد الأدنى للمحتوى البروتيني من 12 غ / 100 غ ، هذا المحتوى يختلف على نطاق واسع في عينات جبن المزارع.

ينت نتائج التحديد الميكروبي لبكتريا اللبنية بتقنية PCR-TTGE . التنوع الجيد لدى صنفى الجبن المدروسين . بينت اشربة PCR-TTGE الوجود المنتظم لبعض العصيات مثل *lactobacillus plantarum* و *lactococcus lactis* ، و الحصول على نمو ملحوظ للبكتيريا اللبنية بعد اضافة الحليب الطازج مبينة بظهور اشربة جديدة و انخفاض. من جهة اخرى أكد التحديد البيوكيميائية للبكتيريا اللبنية غلبة *Lactobacillus Leuconostoc* . بين مظهر 'PAGE-urea تفكيك كازين α , يبدو اكثر فعالية من تفكيك كازين β .

يتكون مظهر نكهة جبن " بوهزة " اساسا من الاسترات و الالدهيدات . سمحت طريقة GC/MS وطريقة GC/MS/O معرفة المركبات العطرة الرئيسية المنتمية لعدة اصناف كيميائية . هذه المركبات تعد المركبات الاساسية لنكهة- جبن بوهزة . يعتبر جبن "بوهزة " من حيث التماسك اقل ليونة. يتغير هذا المظهر خلال صنعه حيث يمر من الحالة السائلة سائل

(اللبن) الى حالة جسم شبه بلاستيكي .يوكد هذا عن طريق نتائج دراسات الريولوجيا. الجبن "بوهزة " متميز بذوق حار قليلا و حموضة معتبرة مع ذوق متوسط الملوحة . دراسة الشكوة بينت ان بينتها البكتيرية مختلفة يتميز نظام بيئي متنوعة و هي وعاء نشط يتفاعل مع *Lben* والجبن.

ورقة المواصفات التفصيلية للجبن بوهزة حددت.

الكلمات الدالة : جبن بوهزة ، الصناعة التقليدية ، تحقيق ، نضج ، شكوة

ABSTRACT

The aim of this work is to characterize the traditional *Bouhezza* cheese through a survey in the eastern region of Algeria and also experiments on the cheese. The investigation related to the geographical delimitation of the area of *Bouhezza* cheese manufacturing and its traditional cheese-making. The survey counted a sample of 289 families which know and manufacture the *Bouhezza* cheese. Results shows that the practice of *Bouhezza* rises from the area of *Chaouia*, which is spread out over several provinces (Oum El Bouaghi, Batna, Khenchela and Tébessa) of the country until the limits of the Tunisian borders. In addition, we confirmed the most dominating diagram of manufacturing which we used for the experiments.

Bouhezza from controlled manufacturing (6 fabrications ripened for 70 days) join those from farmhouse samples (22 samples ripened from 30 to 150 days) as a set of microbiological (total flora, lactic and yeast and mold, pathogenic flora) and physicochemical (pH, acidity, salinity) characteristics. The cheese microflora (8 log ufc/g) is predominated by lactic streptococci and lactobacilli. The results shows that the content of total solids (TS) and fat expressed in TS (F/S) depended on the age of the cheese, younger cheeses containing nearly to 20-25% of TS and those ripened, 2 months and more, to 30-35%. The rate of F/S content ranges from 21 to 39 g/100 g. On the other hand, the minimum protein content in *Bouhezza* is about 12 g/100g of TS, this content varies widely in farmhouse samples.

The lactic acid bacteria identification using PCR-TTGE analysis, revealed the regular presence in *Bouhezza* of *Lactococcus lactis* and *Lactbacillus plantarum* species. A remarkable change in the profiles was noted after addition of raw milk by the appearance of new bands. Similarly, the biochemical identification confirmed the predominance of *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. Proteolysis is marked by a more intense hydrolysis of α -casein than β -casein; and lipolysis by some free fatty acids. The flavor profile of *Bouhezza* consists essentially of esters and aldehydes. GC/MS and GC/MS/ Olfactometry define key aroma compounds in ripened *Bouhezza* cheese. Paste of *Bouhezza* changes consistency to a pseudo-plastic body, and at the end of ripening; the cheese is described with a slightly spicy taste, a rather pronounced acidity and a medium salty flavor. The *Chekoua* of *Bouhezza*, characterized by a diverse microbial ecosystem, is an active container that interacts with the *Lben* and cheese.

A detailed Technical card of *Bouhezza* cheese was established.

Key words: *Bouhezza* cheese, enquiry, traditional cheese-making, ripening, *Chekoua*.

RESUME

Le but de ce travail est de caractériser le fromage traditionnel *Bouhezza* en partant d'une enquête dans la zone des *Chaouia*, à l'Est de l'Algérie et aussi des expérimentations sur le fromage. L'enquête vise la délimitation géographique de la zone de fabrication du *Bouhezza* et la collecte de l'ensemble des informations inhérentes à cette tradition ancestrale. Elle a touché 289 familles connaissant et fabriquant le fromage *Bouhezza*. La répartition géographique des enquêtés montre que la pratique de *Bouhezza* s'apparente dans la région des *Chaouia*, qui s'étale sur les wilayas d'Oum El Bouaghi, Batna, Khenchela et Tébessa, allant jusqu'aux limites des frontières tunisiennes. D'autre part, nous avons confirmé le diagramme de fabrication le plus prépondérant que nous utiliserons pour les expérimentations. Les fromages issus des fabrications contrôlées au lait de vache (6 fabrications de 70j d'affinage) rejoignent ceux provenant de fabrications fermières (22 échantillons de fermes affinés de 30 à 150j) selon un ensemble de caractéristiques microbiologiques (flore totale, flore lactique, levure et moisissure, et flore pathogène) et physicochimiques (pH, acidité, teneur en sel). *Bouhezza* est le sein d'un peuplement microbien assez important (8 log ufc/g), prédominé par les streptocoques lactiques et les lactobacilles. D'autre part, les résultats montrent que la teneur en extrait sec et en matière grasse exprimé en Gras /Sec dépendaient de l'âge du fromage ; les fromages les plus jeunes ont une teneur de 20-25 % d'EST et ceux affinés, 2 mois et plus, de 30-35 %. La teneur en Gras/Sec varie de 21 à 39 g/100g. La teneur minimale en protéines est de 12 g /100g dans l'EST ; cette teneur est très variable dans les fromages de ferme.

L'identification microbienne des bactéries lactiques par la PCR-TTGE révèle la présence régulière dans les fromages de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. Une évolution remarquable dans les profils a été notée après ajout du lait cru par l'apparition de nouvelles bandes. De même, l'identification biochimique a confirmé la prédominance des genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. La protéolyse est marquée par une hydrolyse plus intense de la caséine α_s par rapport à la caséine β ; et la lipolyse par un groupe d'acides gras libres. Le profil aromatique du *Bouhezza* est constitué essentiellement par les esters et les aldéhydes. La GC/MS et la GC/MS/Olfactométrie ont permis de définir des composés aromatiques clés du *Bouhezza*. La pâte de *Bouhezza* change de consistance et devient un corps pseudo-plastique, en fin d'affinage le fromage est décrit avec un goût peu piquant, une acidité assez prononcée et une saveur salée moyenne. La *Chekoua* de *Bouhezza*, caractérisée par un écosystème microbien diversifié, est un contenant actif qui interagit avec le *Lben* et le fromage. Une fiche technique détaillée du fromage *Bouhezza* a été établie.

Mots clés : Fromage *Bouhezza*, enquête, tradition fromagère, affinage, *Chekoua*.