



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULATION
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Faculté des Sciences de la Nature Et De La Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Master Académique

Option : Microbiologie appliquée



Isolement des champignons à effet antibactérien à partir de Jben

Présenté par :

SARI Radhouane

OUANNES Loubna

LADJAL Manal

Soutenu le : 28/06/2022

Devant le jury :

Promoteur : BOUSSAA Abdelhalim

MAA

Université Abbès Laghrou Khenchela

Présidente : HANOUN Saida

MCB

Université Abbès Laghrou Khenchela

Examinatrice : BENREDJEM Lamia

MCA

Université Abbès Laghrou Khenchela

Invité : MAAMAR Hichem

MCB

Université Abbès Laghrou Khenchela

Invitée : KRIM Meriem

MCB

Université Abbès Laghrou Khenchela

Année : 2021/2022

Appreciation

Above all, we thank ALAH the Almighty for giving us the health, courage, will and patience to complete this work.

To Dr. BOUSSA Abed Alhalim

I am very grateful to you for having accepted to be the supervisor of this thesis, I thank you for your participation in the Jury member and for the interest that you carried to my work, we thank him infinitely for his big patience, his encouragements, his not limited help and his judicious councils, during the realization of the present work.

To Doctor BENREDJEM Lamia and Doctor HANOUN Saida

I sincerely thank you for having accepted to be part of the Jury. I also thank you for your contribution to the development of this work.

I would also like to thank:

I respectfully thank my mother, for her unwavering support and encouragement, not only during these five years but throughout my life, and without her I would not be where I am today. You have given me every opportunity to succeed and it is because of you that I am what I am now. I sincerely thank my brother Hashem and my sisters for his precious help and for always being by my side. I always thank my friends Khalil, Ilyas, Sami, Islam. And I will never forget my friends and coworkers Zohir, Aboud, Amor, Rachid, Boubakeur, and Nadjib.

I would like to thank my colleagues LADJEL Manel and OUENNAS Loubna, for their excellent work, their patience and honesty along the way to make this work successful, I am honored to work with you, thank you.

Finally, I address our most sincere thanks to all the relatives, and to all my friends with whom we have worked together, all the people who have contributed from near and far.

These thanks cannot end without a thought for my father **Ammar May God have mercy on him**

I dedicate this work and achievement to my father.

SARI RADHOUANE

Je dédie ce travail

A la source de mon succès, mes parents

A ma chère sœur, wissem pour son soutien

A mes amis, Rima, Ahlem, Donia, Nassira pour leurs encouragements et leur

soutien moral

A Mes collègues Radhouane, Manel qui ont contribué à la réalisation de ce

modeste travail

OUANNES LOUBNA

Je dédie ce modeste travail à ceux qui me sont très chers

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert, et une immense joie, que je dédie mon
travail à :

Ma mère qui me soutenus tous au long de ma vie.

Mon père la lumière de ma vie.

Mes frères et mes sœurs.

Mes amis : Soumia, Ahlem, Selma, Kaouther, Noussa, Rayene, Sabrina,
et Ferial.

Mes collègues Radhouane, Loubna qui ont contribué à la réalisation de ce
modeste travail

Une spéciale dédicace à tous mes collègues et toutes personnes que j'aime.

LADJAL MANAL

عزل الفطريات المجهرية ذات التأثير المضاد للبكتيريا من الجبن

الملخص

يعتبر الجبن من المنتجات التقليدية التي لا تزال تحظى بتقدير في المجتمع الجزائري، الأمر الذي يتطلب بالضرورة محاولة تحسين الإنتاج من حيث الكمية وفي المقابل تقليل تكاليف المواد من حيث الوقت ومواد التخثر. تم استخدام منهجية سطح الاستجابة لتحسين الوقت ودرجة الحرارة وتركيز المنفحة، $CaCl_2$ ، حيث أظهر تحليل النموذج بواسطة ANOVA والانحدار المتعدد تناسبا مع العائد ($P < 0.0001$) مع وجود ارتباط قوي بين القيم المتوقعة والفعالية ($R = 0.99$)

تأثيرات كبيرة لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة على كفاءة تخثر الحليب.

يظل الجبن التقليدي مصدراً مناسباً لتطوير الملوثات التي يمكن أن تسبب اضطرابات في الجهاز الهضمي. هذا التنوع في الكائنات الحية الدقيقة لا يستثني الفطريات المجهرية، حيث أظهرت بعض الدراسات أن بعضها ينتج مضادات الجراثيم.

في هذه الدراسة، تم عزل نوع من العفن *Phoma sp* على وسطتي استزراع PDA و SABOURAUD. تم تحديد الفطر بهذه الصفات المجهرية والميكروسكوبية ثم دراسة قدرته على تثبيط نمو البكتيريا وهي: المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية، الزائفة، العصوية، والكليسيلا الرئوية.

كلمات مفتاحية: جبن، حليب الماعز، أمثلية، سطح استجابة، مضاد للجراثيم.

Isolation of fungi with antibacterial effect from Jben

Abstract

Cheese is considered one of the traditional products still valued in Algerian society, which necessarily requires an attempt to improve production in terms of quantity and in return a reduction in material costs in terms of time and coagulating materials. Response surface methodology was used to improve time, temperature, rennet concentration, CaCl₂, where model analysis by ANOVA and multiple regression showed its proportionality with yield ($P < 0.0001$) with a strong correlation between expected and actual values ($R^2 = 0.99$) Significant effects of temperature and pH on coagulation efficiency.

Traditional cheese remains a favorable source for the development of contaminants that can cause digestive and various disorders. This diversity of microorganisms is not exempt from microscopic fungi, some studies of which have shown that some of them produce antibacterials.

In this study, a species of mold *Phoma* sp was isolated on two culture media PDA and SABOURAUD. The fungus was determined by these macroscopic and microscopic characteristics, then the study of its ability to inhibit the growth of bacteria, namely:

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Klebsiella Pneumoniae*.

Keywords: Djben, goat's milk, optimization, response surface, antibacterial.

Résumé

Le fromage est considéré comme l'un des produits traditionnels encore prisés dans la société algérienne, ce qui demande nécessairement une tentative d'amélioration de la production en termes de quantité et en contrepartie une réduction des coûts matériels en termes de temps et de matériaux coagulants. La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour améliorer le temps, la température, la concentration de présure, le CaCl_2 , où l'analyse des modèles par ANOVA et régression multiple a montré sa proportionnalité avec le rendement ($P < 0,0001$) avec une forte corrélation entre l'attendu et les valeurs réelles ($R^2 = 0,99$) Effets significatif de la température et du pH sur le rendement de coagulation.

Le fromage traditionnel reste une source favorable pour le développement des contaminants pouvant provoquer des troubles digestifs. Cette diversité de micro-organismes n'est pas exempte des champignons microscopiques, dont certaines études ont montré que certains d'entre eux produisent des antibactériens.

Dans cette étude, une espèce de moisissure *Phoma* sp a été isolé sur deux milieux de culture PDA et SABOURAUD. Le champignon a été déterminé par ces caractéristiques macroscopiques et microscopiques, puis l'étude de sa capacité à inhiber la croissance des bactéries, à savoir:

Staphylococcus aureus ; *Escherichia coli* ; *Pseudomonas* ; *Bacille* ; et *Klebsiella Pneumonie*.

Mots-clés : Djben, lait de chèvre, optimisation, surface de réponse, antibactérien.

Table des matières

الملخص

Abstract

Résumé

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Chapitre 01 : Généralités sur les fromages

1. Généralités	3
2. Dénomination et appellation d'origine.....	4
3. Définition.....	4
4. La fabrication du fromage.....	5
4.1. La coagulation ou caillage	5
4.2. L'égouttage.....	5
4.3. Le moulage et le salage.....	5
4.4. L'affinage	6
5. Type de fromage	6
5.1. Au niveau mondial.....	6
5.1.1. Les fromages blancs.....	6
5.1.2. Les fromages mous	7
5.1.3. Les fromages bleus moulés.....	8
5.1.4. Les fromages fondus	8
5.2 Au niveau national	10
5.2.1. Klila	10
5.2.2. Bouhezza.....	10
5.2.4. Michouna	12

5.2.5. Takammart	12
5.2.6. Jben	13

Chapitre 02 : Microbiologie et contamination de fromage

1. Microbiologie des fromages frais	15
1.1. Cultures starter utilisées pour la fabrication de fromage frais	15
1.2. Micro-organismes pathogènes et d'altération associés aux fromages frais.....	15
2. Microflore de Jben	16
2.1. Flore lactique	16
2.1.1. <i>Lactobacillus</i>	16
2.1.2. <i>Lactococcus</i>	17
2.1.3. <i>Streptocoque</i>	18
2.1.4. <i>Leuconostocs</i>	18
2.1.5. <i>Bifidobacterium</i>	19
2.1.6. Pédiocoques	19
2.1.7. Entérocoque	19
2.2. Levures et moisissures	20
2.2.1. Levure	20
2.2.2. Moisissures	20
3. Les risque de contamination des produits laitiers	21
3.1. Les risques microbiologiques	21
3.2. Les risques chimiques	21
3.3. Les risques physiques	21
4. La contamination de fromage	22
4.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	22
4.2. Staphylocoque.....	23
4.3 <i>Salmonella</i>	24

4.4. Bactérie thermorésistante.....	24
4.5. Bactéries sporulées	25

Étude expérimentale

1. Préambule	26
2. Matériel et Méthodes	26
2.1. Objectifs de travail.....	26
3. Fabrication du fromage :.....	26
3.1. La Réception du lait.....	26
3.2. La coagulation.....	26
3.3. Filtration et égouttage	28
3.4. Le moulage	29
4. L'isolement des champignons à partir du Jben.....	31
4.1. Repiquage et purification.....	31
4.2. Identification des champignons isolés	31
4.2.1. Analyse macroscopique	31
4.2.2. Analyse microscopique.....	31
5. Etude de l'activité antibactérienne.....	33
5.1. Préparation de la suspension mycélienne	33
5.1.1. Vérification de la pureté des cultures de mycélium.....	33
5.2. Préparation de surnageant de culture	33
5.3. Test AntibioGramme	34
5.3.1. Méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983	34
5.3.2. Méthode de diffusion en milieu solide	35

Résultats et Discussion

Résultats et discussion	37
1. Résultats.....	37
1.1. Résultats de l'optimisation des conditions de coagulation	37

1.1.1. Etude des surfaces de réponses	38
1.2. Identification morphologique des champignons.....	40
1.2.1. Analyse macroscopique	40
1.2.2. Analyse microscopique.....	41
1.2.3. Classification	45
1.3. Etude l'activité antibactérienne des champignons.....	46
1.3.1. Méthode de puis.....	46
1.3.2. Méthode de disques	47
2. Discussion.....	52
2.1. L'optimisation des conditions de coagulation :	52
2.2. Identification de champignon isolés et leur activité antibactérien :.....	52
Conclusion	55

Liste des figures

Figure 1: Exemple des fromages blancs	6
Figure 2: Exemple des fromages mous.....	7
Figure 3: Exemple des fromages bleus moulés	8
Figure 4: Exemple des fromages fondues.....	9
Figure 5: Classification des fromages.....	9
Figure 6 : Exemple de fromage klila sous sa forme sèche, en différentes tailles et couleurs.....	10
Figure 7: Exemple de fromage Bouhezza avec son assaisonnement en poudre de piment rouge	11
Figure 8 : Exemple de fromage Michouna après l'égouttage.....	12
Figure 9: Le genre Lactobacillus	17
Figure 10 : Le genre de Lactococcus lactique isolé d'un swiedish lait.....	17
Figure 11 : Le genre Streptocoque lactique isolé par Weigmann.....	18
Figure 12: Le genre Leuconostocs.....	19
Figure 13 : L'étape de Filtration et égouttage, (A) : égouttage, (B) : le caillé séparé, (C) : mesurage de rondement.	28
Figure 14 : Le fromage fabriqué après le moulage.....	29
Figure 15 : Diagramme représente les différentes étapes de la fabrication du fromage Jben	30
Figure 16 : Clés d'identification morphologique simplifiée des champignons filamenteux	32
Figure 17 : Schéma représentatif d'un repiquage de champignons isolés dans le bouillon nutritif	33
Figure 18 : Schéma représentatif de différentes étapes de la préparation du surnageant de culture (SC).	34
Figure 19 : Schéma représentatif d'un test antibiogramme par méthode de Barefoot et Kaenhammer.....	35
Figure 20 : Test antibiogramme par Méthode de diffusion en milieu solide.....	36
Figure 21 : Représentation tridimensionnelle des modèles polynomiales de deuxième ordre. (a) : Rendement de coagulation, (b) : pH final du fromage.	39
Figure 22 : Observation macroscopique du champignon Phoma sp. isolé à partir de jben Culture sur le milieu PDA	40

Figure 23 : Observation macroscopique du champignon <i>Phoma</i> sp. Isolé à partir de jben Culture sur milieu Sabouraud.	41
Figure 24 : Observation microscopique du champignon sous grossissement x 04.	42
Figure 25 : Observation microscopique du champignon sous grossissement x 10	43
Figure 26 : Observation microscopique du champignon sous grossissement x 100	44
Figure 27 : Diagramme représente le différent caractères d'identification du <i>Phoma</i> sp	45
Figure 28 : Résultats de tests des puis d'antibiogramme sur les bactéries : <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>S. aureus</i> , et <i>K. pneumonea</i>	46
Figure 29 : Résultats de tests de disques d'antibiogramme sur la bactérie <i>E. coli</i>	47
Figure 30 : Résultats de tests de disques d'antibiogramme sur la bactérie <i>Pseudomonas</i>	48
Figure 31 : Résultats de tests de disques d'antibiogramme sur la bactérie <i>Bacillus</i>	49
Figure 32 : Résultats de tests de disques d'antibiogramme sur la bactérie <i>S. aureus</i>	50
Figure 33 : Résultats de tests de disques d'antibiogramme sur la bactérie <i>K. pneumonea</i>	51

Liste des tableaux

Tableau 1: propriété chimique du fromage traditionnelle Jben de chèvre et de vache... 14	
Tableau 2 : Rapport sur les principales éclosions de listériose et vecteurs alimentaires connexes survenues entre 2007 et 2015 dans différents pays.....	22
Tableau 3 : comportement de <i>S. aureus</i> au cours de fabrication des fromages	23
Tableau 4 : Bactéries aérobies sporulées présentes dans le lait cru	25
Tableau 5 : Matrice des expériences générer par le model CCD.....	27
Tableau 6 : Résultats d'ajustement du model et l'effet des variables explicatives sur les réponses.	37

Liste des abréviations

AOC	Appellation d'origine contrôlée
DOC	Denominazione di origine controllata
IGP	Indication géographique protégée
FAO	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
OMS	Organisation mondiale de la santé
GRAS	Generally Recognized As Safe
SC	Surnageant de culture
M.H	Muller-Hinton
spp	Espèces
Lb	<i>Lactobacillus</i>
UFC	Unités formant colonies
IPS	Bioémulsifiants intracellulaires.
EPS	Bioémulsifiants extracellulaires.
SEC, SEA	Type d'entérotoxines staphylococcique.

Introduction

Introduction

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale. En regard de son contenu en énergie métabolisable, Le lait est un aliment hautement nutritif par sa richesse en glucides, lipides, vitamines et sels minéraux (**Aggad et al., 2009 ; Ahmed et al., 2010**). Alors que, le lait de chèvre joue un rôle essentiel dans l'alimentation humaine, c'est le lait le plus consommée par la communauté rurale, alors qu'il est très peu disponible sur le marché (**Badis et al., 2004**) mais ils sont facilement périssables et difficiles à conserver (**Bencharif, 2001**).

En Algérie, comme dans plusieurs autres pays du monde, l'industrie fromagère occupe une place très importante et une grande variété de produits laitiers fermentés, est préparée du lait crus de chèvre, de vache ou de brebis par des méthodes traditionnelles, dont le but est la bio-préservation du lait pour utilisation ultérieure. Les produits laitiers traditionnels Algériens importants qui ont la signification commerciale sont : *Rayeb, Lben, Klila, Zebdaet Jben*.

Le but de l'industrie fromagère est de transformer le lait en un produit d'utilisation prolongée et de goût différent grâce à diverses actions microbiennes et enzymatiques (**Hui 1992 ; Leroy et Vuyst, 2004**).

La contribution de ces produits alimentaires à l'économie et à la sécurité alimentaire du pays est indéniable malgré leur non - conformité habituelle aux normes réglementaires officielles et leur commercialisation par des voies informelles (par exemple : vente ambulante, marchés ouverts) (**Benkkeroum et Tamime, 2004**), d'où la nécessité de leur valorisation.

Parmi ces produits laitiers traditionnels algériens, nous nous sommes intéressés à la fabrication de fromage frais « Jben ».

Dernièrement, d'importants efforts ont été déployés pour développer l'usage des probiotiques comme agents bio conservateur, les champignons de lait possèdent une capacité inhibitrice contre des bactéries pathogènes, telles que la *Salmonella* et le *Staphylococcus aureus*. Les probiotiques peuvent donc être utiles pour résoudre des problèmes liés à la contamination des produits laitiers.

Les problèmes de contamination de la population humaine par les bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques obligent les scientifiques à intensifier la

Introduction

recherche dans ce domaine (**Simor *et al.*, 2001 ; Anderson *et al.*, 2008 ; Libert *et al.*, 2008**).

L'objectif de notre étude est de contribuer à l'optimisation de la fabrication de fromage, l'isolement des champignons endogènes de fromage, et l'étude de leur activité antibactérienne



Chapitre 01 :
Généralités sur
les fromages



1. Généralités

La fabrication du fromage est pratiquée depuis des milliers d'années, la plupart du temps comme une industrie artisanale. Vers la fin du XIXe siècle, au fur et à mesure de l'industrialisation, la fabrication du fromage s'installe à l'usine ; depuis lors, il y a eu un développement progressif de la technologie, en particulier des équipements, jusqu'à la situation actuelle avec de grandes usines modernes hautement automatisées employant un personnel minimal (**Bennett et Johnston, 2004**).

Le fromage est l'un des aliments les plus fascinants, complexes et diversifiés que l'on apprécie aujourd'hui. Les fromages traditionnels sont habituellement fabriqués dans des zones précises par divers artisans fromagers dont la production totale est suffisamment importante pour être disponible dans le monde entier. Parmi les exemples les plus communément cités, on trouve le camembert de Normandie au lait fabriqué par seulement 5 producteurs, et le parmigiano-reggiano, etc... Toutefois, les fromages artisanaux qui se sont développés ces trente dernières années ont pour la plupart été créés par des fabricants isolés et sont assez souvent difficiles à trouver en dehors de leur région ou pays d'origine, même s'ils sont produits en grande quantité (**Harbutt, 2010**).

2. Dénomination et appellation d'origine

Certains fromages portent des noms qui bénéficient d'une protection légale du fait de leur provenance. La certification d'origine d'un fromage identifie son terroir (en France) ou sa typicité (tipicità en Italie), reconnaissant ainsi que le caractère unique de chaque produit comestible traditionnel est le résultat d'une interaction complexe entre le sol, la végétation et le climat, à laquelle s'ajoutent les méthodes de fabrication traditionnelles et les matières premières, une combinaison qui ne peut être reproduite ailleurs (**Harbutt, 2010**).

Plusieurs pays ont leur propre système, comme l'AOC en France (Appellation d'Origine Contrôlée) et la DOC en Italie (denominazione di origine controllata) ; il existe également l'IGP, créée par l'Union européenne (Indication Géographique Protégée), qui est employée pour les produits alimentaires et les vins traditionnels (**Harbutt, 2010**).

3. Définition

Selon la norme du Codex Alimentarius et la norme internationale FAO/OMS, le fromage frais ou non affiné est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication

Le fromage est défini par le décret française n° 88-1206 du 30 décembre 1988 de la manière suivante : « La dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse ». La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23 g pour 100 g de fromage (**Zeller, 2005**).

4. La fabrication du fromage

L'équipement destiné à la fabrication des fromages et les méthodes employées varient suivant les fabricants pourtant les principes de base restent les mêmes depuis des millénaires. On distingue quatre étapes de ce processus :

4.1. La coagulation ou caillage

Une fois que l'acidité a atteint le niveau souhaité, on y ajoute un mélange spécifique de bactéries appelé ferment lactique. Le lactose va alors se transformer en acide lactique et participer à la saveur, à l'arôme et à la texture du fromage. La plupart des fromages sont faits en y introduisant de la présure (prélevée dans l'estomac d'un animal allaité et non sevré) ou un autre coagulant pour s'assurer que les liens entre les protéines et la graisse présentes dans le lait soient maintenus dans le lactosérum (petit-lait). C'est l'étape fondamentale de la fabrication du fromage, car le niveau de coagulation va déterminer le taux d'humidité final du fromage, qui, à son tour, va influencer la vitesse de la fermentation (**Harbutt, 2010**).

4.2. L'égouttage

Il s'agit d'une séparation du caillé et du petit-lait frais, le caillé ressemble à de la gelée blanche, et le lactosérum est un liquide jaune-vert. Si ces deux éléments sont séparés en douceur, on obtiendra des fromages plus souples et assez humides, tandis que le fait de couper le caillé va entraîner une perte plus importante de lactosérum et donner des fromages plus durs. Plus les morceaux seront petits, plus le fromage final sera dur et sa texture fine. Le lactosérum est évacué une fois atteinte l'acidité souhaitée (**Harbutt, 2010**).

4.3. Le moulage et le salage

Le caillé est alors placé dans des moules ou des cercles et parfois pressé avant d'être ressorti. Une fois dehors, le fromage est frotté ou saupoudré de sel, ou bien encore plongé dans de la saumure avant d'être placé dans une chambre froide ou un hâloir pour l'affinage (**Harbutt, 2010**).

4.4. L'affinage

C'est le moment où vont s'affirmer le caractère du lait et les saveurs uniques nées des pâturages. Un bon affineur, celui qui s'occupe de la maturation des fromages, peut amener le plus simple des fromages à révéler chacune des nuances de sa saveur. Les produits artisanaux changent de jour en fonction du pâturage, de la saison, des conditions à l'intérieur de la cave et du fabricant lui-même ; ainsi, la cuvée du fromage est journalière, et c'est ce qui le rend si extraordinaire et si sublime (**Harbutt, 2010**).

5. Type de fromage

5.1. Au niveau mondial

5.1.1. Les fromages blancs

Ces types de fromages relativement jeunes sont parfois appelés fromages crus. Ils sont vendus sous forme de robinets, de blocs ou de petits barils. Certains contiennent de la crème du beurre, tandis que d'autres contiennent des herbes et des épices. Certains sont recouverts de feuilles de vigne, la plupart sont fabriqués à partir de lait de vache, certains à partir de lait de chèvre ou de brebis. La plupart peuvent être utilisées en cuisine, notamment en cheesecake (gâteau au fromage). Il est préférable de les conserver au réfrigérateur (figure 01) (**Leto et Bode, 2006**).



Cottage cheese



Quark plain and herbs



Philadelphia block or



Fresh Mozzarella



Feta



Fresh Ricotta

Figure 1: Exemple des fromages blancs (**Leto et Bode, 2006**).

5.1.2. Les fromages mous

Dans ce groupe appartiennent certains des fromages à pâte molle les plus connus et les plus appréciés au monde, notamment :

- ✓ Brie – le roi des fromages.
- ✓ Camembert - le prince des fromages.

Ce sont probablement les fromages les plus imités au monde.

Mais il y a considérablement plus de fromages de ce type que ces deux-là. Ils sont généralement vendus dans des étuis en bois ou en carton, ou libres de boîtes de toutes formes, du grand brie rond plat aux petits quartiers de camembert.

Tous sont aux premiers stades d'être plus affinés que les fromages blancs ; certains peuvent avoir une saveur et une odeur très fortes, tous ont une croûte comestible, quelques-uns ont une croissance de moisissure verte ou bleue. Ils doivent être conservés dans un endroit frais mais jamais au réfrigérateur (figure 02) (Leto et Bode, 2006).



Ripe Camembert



Section of ripe Brie



Swissgoat Tomme



Reblochon



D'Angloys le Pié



Cambozola

Figure 2: Exemple des fromages mous (Leto et Bode, 2006).

5.1.3. Les fromages bleus moulés

Les fromages bleus se trouvent partout dans le monde, dans toutes les tailles et formes, et à ce groupe appartiennent certains des fromages les plus célèbres. Induite par la croissance de la moisissure *Penicillium*, qui évolue à l'intérieur d'un bleu marbré foncé comme dans le cas du Stilton à un vert clair comme dans le cas du Roquefort, la couleur peut s'intensifier selon l'âge du fromage. Même certains fromages à pâte rosée appartiennent à ce groupe. Leur texture peut être friable à lisse, leur saveur douce à forte. Ils sont très appréciés des amateurs de fromage et sont incontournables sur tout plateau de fromages respectable (figure 03) (Leto et Bode, 2006).



Figure 3: Exemple des fromages bleus moulés (Leto et Bode, 2006).

5.1.4. Les fromages fondus

Fromage fondue est un terme désignant les fromages à pâte mi-dure et n'a pas grand-chose à voir avec le célèbre plat de fromage chaud suisse du même nom. Presque tous ont une saveur et une odeur fortes et marquées, souvent appelées « puants », et lorsqu'ils sont placés sur un plateau de fromages dans un restaurant, ils doivent être recouverts d'une cloche.

Ils sont disponibles dans toutes sortes de formes et de tailles (figure 04). Ils sont généralement à base de lait de vache ou de babeurre de vache, cru ou cuit (Leto et Bode, 2006).

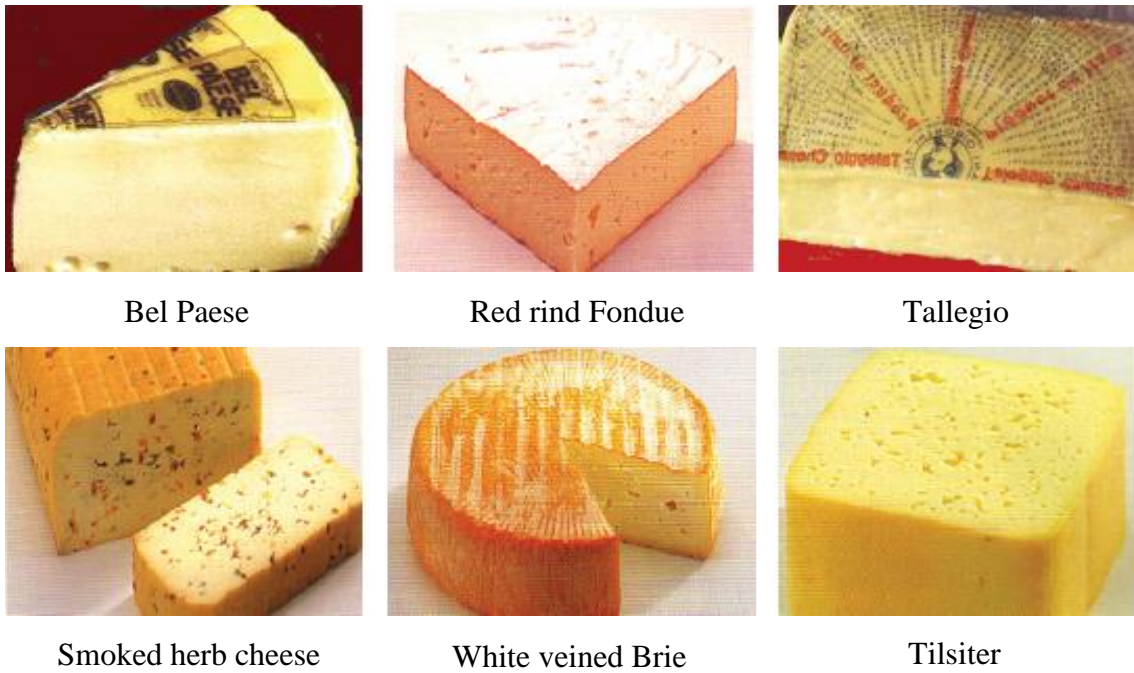


Figure 5: Exemple des fromages fondus (Leto et Bode,2006).

La figure suivante (figure 5) représente la classification des fromages selon la technologie Française (Almena-Aliste, Mietton, 2014).

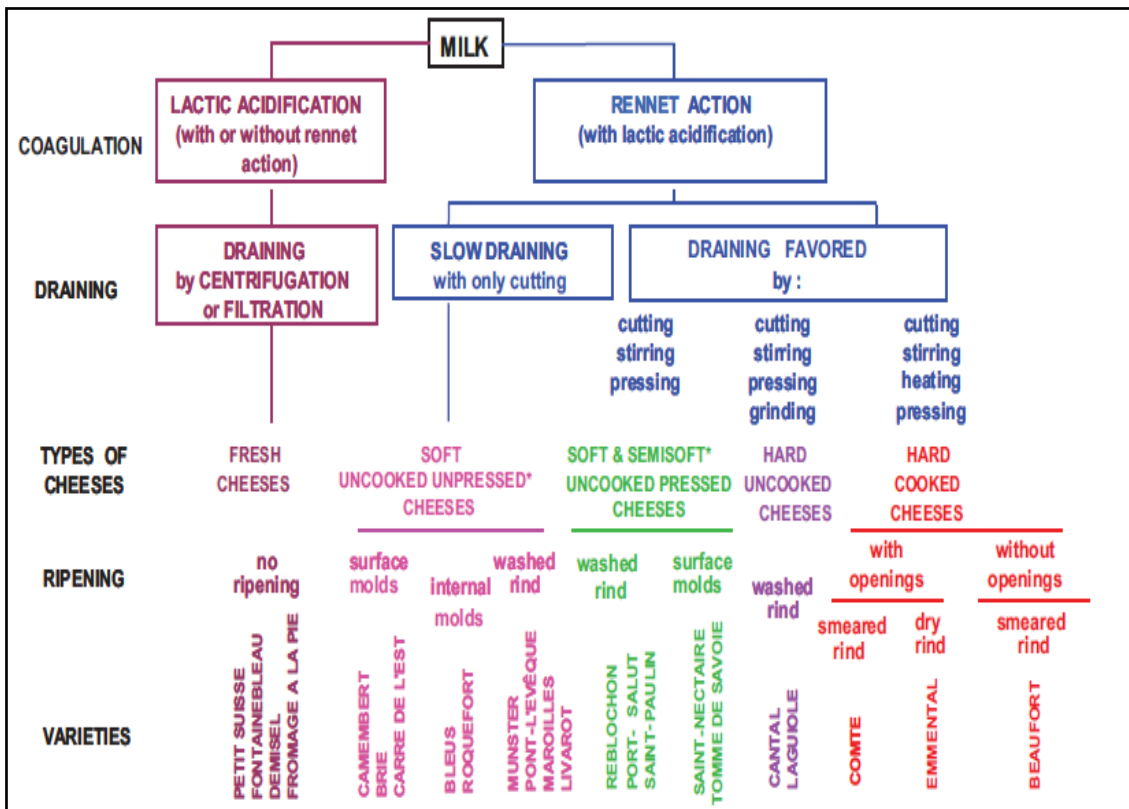


Figure 4: Classification des fromages (Almena-Aliste et Mietton, 2014).

5.2. Au niveau national

5.2.1. Klila

Le klila (figure 6) est un fromage fabriqué dans plusieurs régions d'Algérie, surtout les régions rurales. Il ressemble fortement au Jameed du Moyen-Orient et au Chhana de l'Inde. On le retrouve dans les hauts plateaux, aussi bien à l'Ouest (Naâma) qu'à l'Est du pays (Guelma, Souk-Ahras), sa composition physico-chimique peut varier d'une région à l'autre et d'un lait à un autre, il est préparé à partir de lait cru de chèvre, brebis, vache ou de chamelle... (Meghoufel, 2019).

La préparation de ce fromage commence par la coagulation spontanée d'un lait cru à température ambiante (de 24 à 72h selon la saison), le rayeb obtenu est ensuite écrémé dans une chekwa. Pour le transformer en fromage sec, il suffit juste de mettre le Klila dans un tissu très fin et de presser à l'aide d'une pierre pour l'égoutter encore plus, puis le découper en morceaux et de le laisser sécher au soleil jusqu'à ce qu'il durcisse pendant environ 3 jours (Meghoufel, 2019).



Figure 6 : Exemple de fromage klila sous sa forme sèche en différentes tailles et couleurs (Meghoufel, 2019).

5.2.2. Bouhezza

Ce fromage affiné à pâte épicée (figure 7) est préparé à l'origine à partir de lait de chèvre et parfois de brebis dans une outre (chekoua) avec du Lben, du sel et du lait cru. De nos jours le lait de vache est le plus utilisé car il est plus disponible. On le retrouve dans la région des Aurès, principalement dans les villes d'Oum El Bouaghi, Batna et Khenchela et jusqu'à Tébessa vers la frontière Tunisienne où il porte parfois le nom «

MlahDh'ouab » ou « Bou Mellal ».

La particularité de ce fromage est que toutes les étapes de fabrication se font en même temps et continuellement pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois (3 à 4 mois) avec un égouttage spontané à travers les pores naturels de la chekoua (**Meghoufel, 2019**).

La microflore lactique du Bouhezza est essentiellement composée des genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* (10^7 UFC/g), qui sont responsables de la diminution du pH et de l'augmentation de l'acidité, et jouent un rôle majeur dans la dégradation de la matière azotée (figure 7) (**Meghoufel, 2019**).



Figure 7: Exemple de fromage Bouhezza avec son assaisonnement en poudre de piment rouge (**Meghoufel, 2019**).

5.2.3. Kéméria

Kéméria /kemariya ou takmmèrit (en Berbère) est un fromage traditionnel très prisé par les habitants à Ghardaïa dans la région du Mزاب et consommé surtout avec du thé.

Il est traditionnellement fait à partir de lait de chèvre de brebis et de nos jours à partir de lait de vache pour sa fabrication industrielle, parfois le lait de chamelle est mélangé aux autres laits pour sa préparation (**Meghoufel, 2019**).

Le lait cru est salé en masse (2g/l de lait) puis chauffé modérément (à 37°C), la présure animale (caillette de chevreau) est ajoutée à raison de 1g/l de lait. Après 30 min de coagulation, le fromage est découpé puis mis à égoutter dans un linge propre (un chèche), l'égouttage spontané peut aller de 30 min à 24 h selon le type de lait utilisé, après

cette étape, le fromage est moulé en galette. La présure végétale (Extrait d'artichaut ou chardon de Marie) peut être utilisée à la place de la caillette si cette dernière fait défaut (Meghoufel, 2019).

5.2.4. Michouna

Le Michouna, représenté dans la Figure 8, est un fromage largement préparé et consommé dans la région de Tébessa, plus dans des zones rurales que urbaines, il est consommé de façon régulière, jusqu'à plusieurs fois par semaine (localités d'El Kouif, Bir D'hab), mais il reste inconnu du grand public.

Ce fromage frais est préparé traditionnellement à partir de lait de chèvre pour une auto- consommation familiale, on le retrouve surtout au niveau des fermes où la matière première est la plus disponible. Le lait de vache est de plus en plus utilisé pour faire le Michouna de nos jours, car il est plus abondant et facilement acquis par les mères de familles (Meghoufel, 2019).



Figure 8 : Exemple de fromage Michouna après l'égouttage (Meghoufel,2019).

5.2.5. Takammart

Takammart qui veut dire « fromage » en Tamahaq (langue des Touaregs), est consommé dans la région du Hoggar, et préparé à base de lait cru de chèvre ou de chamelle, dans lequel est introduit un morceau de caillette de chevreau Après coagulation (quelques heures) le caillé formé est déposé, en petits tas, à la louche sur une natte, puis pétri pour évacuer le lactosérum, puis redéposé sur une autre natte cette fois fabriquée avec des tiges de fenouil sauvage qui lui donnera son arôme. La natte est ensuite exposée au soleil durant deux jours puis placée à l'ombre jusqu'à durcissement de la pâte. Ce

fromage peut être laissé à affiner pendant des mois (Meghoufel, 2019)

5.2.6. Jben

Le Jben est un fromage traditionnel frais populaire en Algérie, consommé surtout en milieu rural, et est retrouvé dans des régions qui vont des montagnes de l'est (Souk Ahras, Guelma, Tébessa, Khenchela et Batna) aux steppes de l'ouest algérien (El Bayadh, Naâma), des zones semi- arides à vocation pastorale.

Ce fromage est le produit d'une transformation des laits d'un cheptel diversifié et d'une fermentation par une flore lactique indigène. Préparé à l'origine à partir de lait cru de chèvre ou de brebis, et de plus en plus avec du lait de vache, suivant une méthode de fabrication générale commune à plusieurs zones géographiques, mais qui comporte des différences spécifiques à chaque région (Meghoufel, 2019).

Le processus de préparation nécessite trois grandes étapes essentielles : la maturation du lait cru, sa coagulation et l'égouttage du caillé : le lait cru est laissé à température ambiante, pour s'acidifier spontanément pendant un temps variable (généralement 24h). Cela va favoriser la multiplication d'une flore lactique qui va jouer un rôle important dans l'acidification du lait (Meghoufel, 2019)

Le fromage frais « Jben » ne présente pas de caractéristiques définies (stables) à cause des méthodes artisanales utilisées pour sa préparation, reposant essentiellement, sur les connaissances acquises à partir d'une longue expérience. Les arômes, les propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du fromage dépendent de celles du lait cru qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation (Tableau 1) (Meghoufel, 2019).

Généralement, Le pH et l'acidité titrable sont les paramètres les moins variables du « Jben » Cependant, les matières solides totales du Jben sont les facteurs les plus variables car ces derniers dépendent de la durée d'égouttage. Étant donné que les lipides, le lactose et les protéines constituent les principaux composants de l'ensemble des matières solides en « Jben », ils sont directement influencés par les variations des dites matières solides (Meghoufel, 2019).

Tableau 1: propriétés chimiques du fromage traditionnelle Jben de chèvre et de vache (Meghoufel,2019).

Type de Jben	PH	Acidité D°	Matière sèche (%)	Humidité (%)
Jben de chèvre	5,51 ± 0,21	33 ± 0,76	56,12±21,28	43,88±21,28
Jben de vache	4,42	79,4	55,8	-

A large decorative floral wreath framing the text, composed of various leafy branches and small flowers, rendered in a black and white line-art style.

Chapitre 02 :
Microbiologie et
contamination de
fromage



1. Microbiologie des fromages frais

L'utilisation de la coagulation de la présure (utilisée dans la plupart des fromages frais) ou de l'acidification directe est une pratique courante dans l'industrie laitière. L'acidification directe est plus contrôlable que l'acidification biologique et, contrairement aux levains, n'est pas sensible à l'infection bactériophage. Cependant, les enzymes des bactéries starter sont essentielles dans l'affinage des fromages et l'acidification chimique est principalement utilisée pour les variétés de fromages pour lesquelles la texture est plus importante que la saveur (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

1.1. Cultures starter utilisées pour la fabrication de fromage frais

Les fromages frais, avec une durée de conservation limitée, ont la protéolyse primaire, qui est réalisée par les agents coagulants et, dans une moindre mesure, la plasmine, les coagulants résiduels et les enzymes des organismes de départ.

Les levains ajoutés lors de la fabrication des fromages frais sont du groupe mésophile dont *Lactobacillus. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, avec une capacité différente de produire du citrate. Le diacétyle est un produit majeur du métabolisme du citrate par les *lactococcus* et est recherché dans de nombreuses variétés de fromage frais telles que le fromage cottage (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

1.2. Micro-organismes pathogènes et d'altération associés aux fromages frais

Les niveaux d'humidité élevés et la teneur nutritive des fromages les rendent plus sensibles aux micro-organismes pathogènes et de détérioration. Plusieurs rapports ont présenté la prévalence de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp et *Staphylococcus aureus* dans les fromages prêts à la consommation. En ce sens, l'utilisation de lait pasteurisé dans la fabrication de fromages frais à pâte molle est essentielle (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

En règle générale, une bonne hygiène des fromageries, le traitement thermique du lait, l'ajout de sel, la qualité des levains constatés par la production d'acide ainsi qu'un contrôle strict des paramètres de fonctionnement comme la température de stockage et de transformation sont des facteurs importants à prendre en compte avec la transformation du fromage

Les micro-organismes psychrotrophes à Gram négatif tels que *Pseudomonas* spp.,

les bactéries coliformes, les moisissures et les levures ont été fréquemment associés à la détérioration des fromages frais (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

2. Microflore de Jben

Les genres dominants isolés de Jben étaient *Lactobacillus* (34 % des isolats), *Lactococcus* (27 %), *Leuconostoc* (27 %) et *Enterococcus* (10 %). À l'exception du genre *Enterococcus*, des résultats similaires ont été rapportés.

Les conditions non standardisées de la transformation Jben aboutissent à un produit de qualité hygiénique variable, qui peut être un véhicule pour des agents pathogènes responsables de maladies graves d'origine alimentaire telles que *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *Bacillus* (**Mouna et al., 2005**).

2.1. Flore lactique

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires ; tel que les fromages ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Dortu et Thonart, 2009**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Dortu et Thonart, 2009**).

2.1.1. *Lactobacillus*

Les *lactobacillus* (Figure 9), sont des membres des bactéries lactiques, un groupe phylogénétiquement diversifié de bactéries à Gram-positif caractérisées par la formation d'acide lactique comme produit final unique ou principal de leur fermentation de sucre.

Le genre *Lactobacillus* est le plus grand des genres inclus dans les bactéries lactiques avec plus d'une centaine d'espèces reconnues à l'heure actuelle (**Åvall et al., 2005**).

Les *Lactobacillus* se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*) Figure 10 (Tormo, 2010).

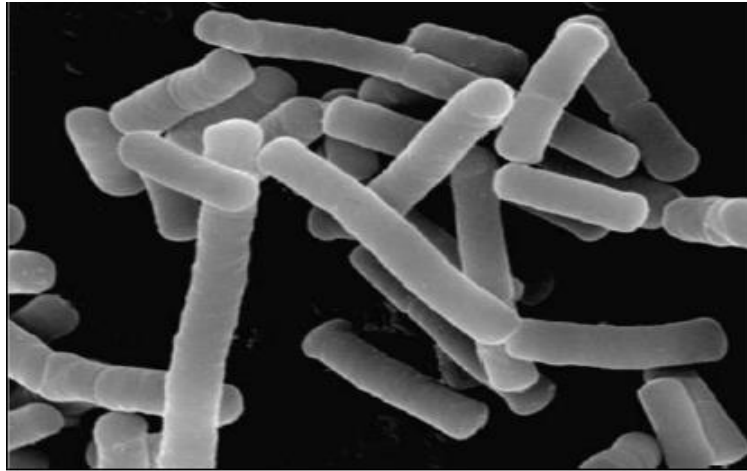


Figure 9: Le genre *Lactobacillus* (Kediri et Abderrahim, 2019)

2.1.2. *Lactococcus*

La morphologie peu spectaculaire des lactocoques à Gram positif est caractérisée par des cellules ovoïdes se présentant isolément, par paires ou en chaînes, et étant souvent allongées dans le sens de la chaîne. L'une des premières micrographies de Weigmann (1899) est illustrée à la figure 10. La longueur de la chaîne dépend principalement de la souche, parfois aussi influencée par la croissance (Teuber, 1995).

Ils sont communément appelés « streptocoques lactiques mésophiles ». Il est tentant de suggérer que le premier isolement, identification et description de l'entité chimique acide lactique par Carl Wilhelm Scheele à partir de lait aigre en Suède en 1780 (Teuber, 1995).

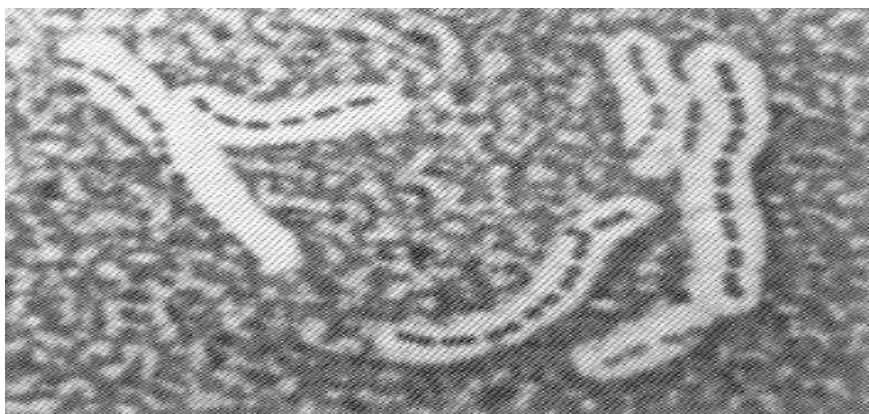


Figure 11 : Le genre de *Lactococcus* lactique isolé d'un swedish lait (Teuber, 1995)

2.1.3. Streptocoque

Les streptocoques sont des coques à Gram positif, non mobiles, non sporulés, catalase négative, qui se présentent par paires ou en chaînes (Figure 11). La plupart des streptocoques sont des anaérobies facultatifs et certains sont des anaérobies obligatoires (stricts). La plupart nécessitent un milieu enrichi (gélose au sang). Les *Streptococcus* du groupe A ont une capsule d'acide hyaluronique (Patterson,1996).

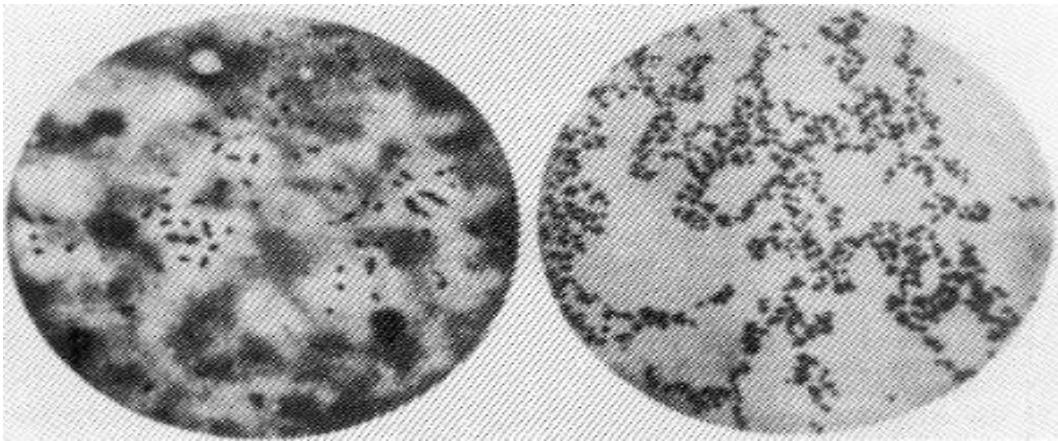


Figure 12 : Le genre Streptocoque lactique isolé par Weigmann (Teuber, 1995).

2.1.4. Leuconostoc

Les espèces du genre *leuconostocs* se trouvent traditionnellement en association avec la matière végétale, les légumes en fermentation, le lait, les produits laitiers et les vins. Plus récemment, elles ont également été trouvées dans des viandes conservées réfrigérées et dans le sang humain. Ce sont des bactéries coccus à Gram positif de forme sphériques, avec un mode de regroupement généralement en paires et en chaînes (Figure 11), immobiles et non sporulées, catalase négative, anaérobies facultatifs, et résistantes à la vancomycine.

Elles sont généralement considérées comme non pathogènes, leur température optimale de croissance est entre 20 à 30 °C, considérées hétérofermentaires (utilise une combinaison du pentose) (Thunell, 1995).

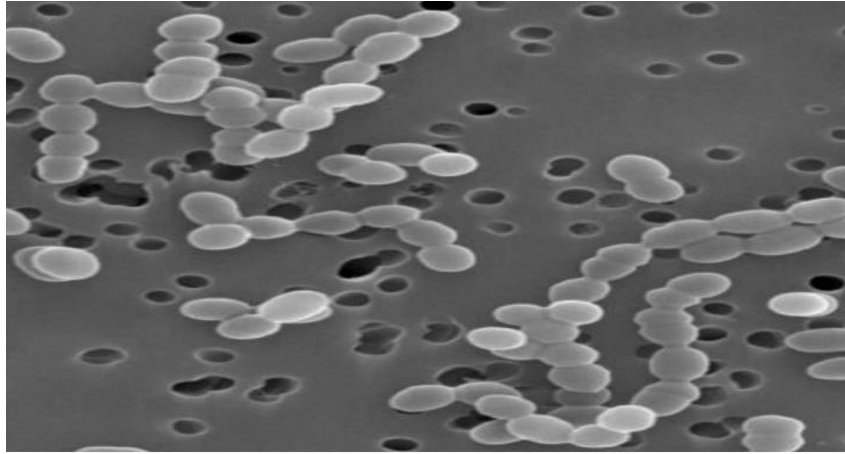


Figure 13: Le genre *Leuconostoc* (Kediri et Abderrahim, 2019)

2.1.5. *Bifidobacterium*

Les bactéries de ce genre se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V ou Y, mais aussi coccoïdes. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur pourcentage en bases nucléiques G + C élevé, et la présence d'une enzyme : la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques (Naïma, 2019).

Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37 °C et 41 °C. Elles se développent à pH supérieur à 5 et sont isolées de l'Homme et des animaux (Naïma, 2019).

2.1.6. Pédiocoques

Ce sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrades. Ces bactéries sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées (Naïma, 2019).

Les pédiocoques sont retrouvés dans la nourriture (comme les produits laitiers, la viande fermentée et la bière) et dans l'intestin de l'homme et d'animaux (Naïma, 2019).

2.1.7. Entérocoque

Ce genre regroupe des bactéries commensales de l'intestin. L'espèce fréquemment rencontrée dans l'alimentation est essentiellement *Enterococcus faecalis*. Les

entérocoques sont des coques qui peuvent être mobile, homofermentaire et généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol (Naïma, 2019).

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes dans l'intestin de l'Homme et des animaux, dans les eaux usées, dans l'eau douce, dans l'eau de mer, dans le sol et sur les végétaux. La plupart des espèces de ce genre participent à la composition des microflore intestinales (Naïma, 2019).

On les retrouve aussi dans le lait et les produits laitiers, les produits carnés et de la pêche. Dans les produits laitiers ils atteignent au maximum des niveaux de 10^7 ufc/g (Naïma, 2019).

Le genre *Enterococcus* comprend des bactéries ayant une température de croissance optimale de 35°C. Elles sont capables de résister à des conditions hostiles et à un chauffage de 60°C durant 30 minutes (Naïma, 2019).

2.2. Levures et moisissures

2.2.1. Levure

Les levures se trouvent dans une grande variété de fromages ; cependant, dans la plupart des cas, leur rôle dans l'affinage du fromage n'est pas clair. Le faible pH, la faible teneur en humidité, la basse température et la teneur élevée en sel du fromage affiné favorisent la croissance de la levure (Tom et al., 2001).

Les levures sont utiles en industrie laitière car elles peuvent servir comme agents d'aromatisation. Elles entraînent des altérations du produit final (odeurs désagréable, gonflement des produits ou de leur emballage...) (Tom et al., 2001).

2.2.2. Moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des eucaryotes hétérotrophes, ils sont obligés de prélever le carbone et l'azote nutritifs de la matière grasse, le sucre et les protéines. D'une façon générale, les aliments sont des substrats très favorables à leur développement, ces germes peuvent y causer des dégradations par défaut d'apparence, mauvais goût, ou plus gravement production de mycotoxines (Cahagnier, 1998).

3. Les risques de contamination des produits laitiers

De tout temps, des bonnes pratiques d'hygiène, telles que la cuisson des aliments ou la conservation par le froid, ont été utilisées afin de réduire les risques sanitaires liés à la consommation d'aliments, mais malheureusement les risques sont toujours capables d'arriver.

3.1. Les risques microbiologiques

Le lait étant un milieu idéal pour la croissance des microorganismes tels que les bactéries pathogènes, il constitue un enjeu majeur de sécurité alimentaire dans l'industrie laitière. Ceux-ci peuvent être introduits dans le lait depuis le milieu environnant ou depuis les animaux même.

Les principaux microorganismes impliqués sont *Brucella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* entéropathogène, *Salmonella*, *Staphylococcus* à coagulase positive. Ces quatre dernières bactéries sont capables de survivre lors du processus de fabrication des fromages et d'y rester viables pendant quatre semaines (**Renata et Martin, 2002**).

3.2. Les risques chimiques

Peut-être accidentellement introduit dans le lait et les produits laitiers, les rendant dangereux et impropres à la consommation. Le lait peut être contaminé lorsque les mammifères consomment des aliments et/ou de l'eau contenant des produits chimiques. D'autres causes de contamination peuvent être dues à un contrôle insuffisant des équipements, de l'environnement et des installations de stockage du lait. Les risques chimiques comprennent les détergents, les désinfectants pour piscines, les désinfectants laitiers, les antiparasitaires, les antibiotiques, les herbicides, les insecticides et les fongicides (**Bryan et WHO, 1994**).

3.3. Les risques physiques

Les aliments peuvent contenir parfois des facteurs physiques de risques pour le consommateur. Ce sont soit des éléments radioactifs, soit des corps étrangers solides comme des débris de verre ou de métal, de plastique ou d'os (**Branger et al., 2007**).

4. La contamination de fromage

Les fromages sont plus sensibles aux contaminations à cause de leur teneur riche en éléments nutritif, donc est considéré comme un milieu favorable pour certain microorganisme, parmi ces microorganismes qui peuvent contaminer les fromages on distingue :

4.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes est un petit bacille à Gram positif, facultativement anaérobie, qui mesure habituellement de 0,5 à 2 µm de longueur et 0,5 µm de diamètre, *Listeria* pouvait se développer à des températures comprises entre +1 à +2°C et +45°C, avec un optimum de croissance entre 30 et 37°C. C'est donc une bactérie psychrotrophes (capable de se développer à une température inférieure ou égale à 7°C) et qui se multiplie donc dans les aliments réfrigérés (**Pujol-Dupuy, 2004**).

La survie et la croissance de *L. monocytogenes* dans les fromages dépendent de facteurs intrinsèques de l'aliment, par exemple, le pH et l'activité de l'eau, et de facteurs extrinsèques tels que l'humidité relative, la température de stockage et le matériau d'emballage. Les techniques de transformation utilisées dans la production alimentaire, les changements de température et l'état physiologique des cellules peuvent tous entraîner des variations de survie et de croissance de *L. monocytogenes* dans les fromages. Les cellules précédemment stressées exposées à des conditions sublétales peuvent rendre cette bactérie plus résistante aux facteurs de stress supplémentaires (**Kieran et Olivia, 2018**). Le tableau 2 représente quelques statistiques sur les listérioses et les vecteurs qui y sont liés dans le monde.

Tableau 2 : Rapport sur les principales éclosions de listériose et vecteurs alimentaires connexes survenues entre 2007 et 2015 dans différents pays (**Kieran et Olivia, 2018**).

Véhicule alimentaire	L'année	Nombre des cas	Nombre de décès	Pays
Le camembert	2007	17	03	Norvège
Fromage à la mexicaine	2008-2009	8		États-Unis
Fromage	2009-2012	30	02	Portugal
Fromage ricotta salata	2012	20	04	États-Unis
Fromages aux truffes	2013	05	01	États-Unis

4.2. Staphylocoque

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, non sporulés, regroupés en amas, immobiles, anaérobies facultatifs et possédant une catalase. Le critère de base de leur classification est la production de coagulase. On distingue trois espèces à coagulase positive : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, et trente espèces à coagulase négative (**Brisabois et al., 1997**).

La présence des staphylocoques dans les fromages représente un risque pour la santé humaine, parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire à staphylocoques (**Brisabois et al., 1997**).

La contamination du lait peut survenir par l'intermédiaire de porteurs sains ou infectés, ou par l'environnement. Chez les bovins, *S. aureus* a été isolée des narines. On le retrouve dans de petites lésions cutanées et dans les manchons des machines à traire. La colonisation des trayons peut entraîner l'infection de la mamelle (**Brisabois et al., 1997**).

Comme le montre le Tableau 2, *S. aureus* est capable de se développer et de produire des entérotoxine staphylococcique (SE) dans la plupart des grandes familles de fromages, y compris dans les fromages Jben et à pâte pressée cuite, les cas sont plutôt rares du fait de la cuisson des grains de caillé en cuve de fabrication, qui élimine généralement cette bactérie du produit. Les fromages à pâte pressée non cuite et à pâte molle sont les plus sensibles au risque lié à *S. aureus* (Tableau 3) (**Manon, 2010**).

Tableau 3 : comportement de *S. aureus* au cours de fabrication des fromages

Type de technologie	Fromage	Croissance de <i>S. aureus</i>	Présence d'entérotoxines
Pâte fraîche	Jben	Croissance au cours des premières 24h de la fabrication	SEC* détectée dans les laits inoculés avec 10^5 <i>S. aureus</i> /ml - Non détectée avec 10^5 <i>S. aureus</i> /ml.
Caillé en saumure	Feta	Croissance jusqu'à la mise en saumure et diminution de la population en cours du stockage	Non déterminée
Pâte filée	Mozzarella	Croissance (4 générations)	Non détectée
Pâte molle	Camembert au lait de chèvre à	Croissance rapide jusqu'au salage	SEA** détectée et quantifiée dans les laits inoculés avec 10^5 <i>S. aureus</i> /ml - Non

	coagulation lactique		quantifiable avec 10^5 <i>S. aureus</i> /ml.
	Camembert au lait de chèvre à coagulation présure	Croissance rapide jusqu'au salage	SEA** détectée et quantifiée dans les laits inoculés avec 10^4 , 10^5 ou 10^6 UFC/ml

4.3. *Salmonella*

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, capables de se multiplier à des températures comprises entre 5 et 45°C. Les *salmonelles* colonisent principalement le tube digestif de leurs hôtes. Elles ne font pas partie de la flore commensale du tube digestif de leurs hôtes, mais le portage asymptomatique reste très fréquent (Guy, 2006).

Des conditions de températures favorables, une acidification lente et un phénomène de concentration de la bactérie lors de la formation du caillé, entraînent une augmentation du nombre de *Salmonelles* en début de fabrication (Guy, 2006).

Les fromages n'offrent pas un milieu de culture idéal pour le développement des *Salmonelles*. D'ailleurs, les produits laitiers ne sont pas les aliments les plus souvent incriminés dans les cas d'intoxication par les *Salmonelles*. Néanmoins, leur capacité de survie et d'adaptation n'est pas à négliger (Guy, 2006).

4.4. Bactérie thermorésistante

Dans des conditions de pasteurisation, traitement thermique à 63°C pendant 30 min ou équivalent, les pathogènes non sporulés, les levures et moisissures, les bactéries Gram négatif et de nombreuses bactéries à Gram-positif sont détruites. Cependant, les thermorésistantes et les thermophiles peuvent survivre dans ces conditions et, avec les sporulants, peuvent réduire la durée de conservation des produits laitiers conservés dans des conditions non réfrigérées (Barbaros et Gülsün, 2014).

Les espèces thermorésistantes de lait cru comprennent *Microbacterium* spp. (par exemple, *M. lacticum*), *Micrococcus* spp., spores de *Bacillus* et *Clostridium*, *Streptococcus* (par exemple, *S. thermophilus*), *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp. (par exemple, *E. faecium*) et *Lactobacillus* spp. (Barbaros et Gülsün, 2014).

Les sources de bactérie thermorésistantes dans le lait cru sont le pis infecté et l'extérieur du pis et des trayons, ainsi que le sol, l'eau et les machines à traire. Ils peuvent se développer rapidement avec les bactéries lactiques, lorsque le lait cru est conservé dans

des conditions non réfrigérées (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

4.5. Bactéries sporulées

Ces microorganismes appartiennent principalement aux genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Geobacillus*. Ils sont à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatifs, à l'exception de *Clostridium* spp. qui sont strictement anaérobies. Ces derniers poussent dans le fromage plutôt que dans le lait (Tableau 4). *C. tyrobutyricum* provoque un soufflage tardif dans les fromages à pâte dure. *C. sporogenes* et *C. butyricum* sont également impliqués dans les défauts du fromage tels que les taches putrides dans le fromage suisse (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

Tableau 4 : Bactéries aérobies sporulées présentes dans le lait cru (**Barbaros et Gülsün, 2014**).

Type	Genres	Comptes habituels dans le lait cru	Les espèces les plus commune
Psychrotolérant	<i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i>	0.003–3.5 spores ml ⁻¹	<i>B. cereus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>P. polymyxa</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. thuringiensis</i>
Mésophile	<i>Bacillus</i>	0–965 UFC ml ⁻¹	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i>
Thermophiles facultatifs ou thermotolérants	<i>Bacillus</i>	-	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sporothermodurans</i> , <i>B. subtilis</i>
Thermophiles obligatoires	<i>Geobacillus</i> , <i>Anoxybacillus</i>	<10 UFC ml ⁻¹	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>



***Etude
expérimentale***



Etude expérimentale

1. Préambule

Dans le cadre d'élaboration et de formulation d'un fromage frais, notre travail comporte trois parties principales : une partie consacrée pour la fabrication du fromage « Jben » à partir d'une présure animale, la deuxième partie consacrée pour l'isolement des champignons, et la troisième partie consacrée pour l'étude d'activité antibactérienne de champignons isolés.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Objectifs de travail

Trois objectifs ont été tracés pour cette investigation uniquement par les points suivants :

- Optimisation de la fabrication de fromage frais traditionnel au lait de chèvre.
- Isolement des champignons endogènes de fromage ;
- Etude de l'activité antibactérienne de ces champignons isolés.

3. Fabrication du fromage :

3.1. La Réception du lait

Le lait de chèvre a été acheté le 12 Mars 2022, chez un éleveur privé, ce dernier nous a annoncé que les chèvres sont élevées d'une manière traditionnelle, de la région Baghai, wilaya de Khenchela.

Le lait était collecté manuellement de façon traditionnelle, et les échantillons ont été transportés dans une glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

3.2. La coagulation

Après homogénéisation du lait de chèvre, l'optimisation de la coagulation a été réalisée par la méthodologie des surfaces de réponses. Le plan central composite (CCD) a été utilisé pour identifier les valeurs optimales des variables indépendantes suivantes : taux d'emprésurage (100-600mg/l), température (20-60°C), temps (1-3heures) et l'ajout du sel CaCl_2 (0-250mg/l). La matrice des expériences générée par le model CCD est résumée dans le tableau 5

Etude expérimentale

L'ajustement du model a été vérifié par le test d'ANOVA, et la linéarité des interactions entre les facteurs indépendants a été vérifié par la régression en utilisant la méthode des moins carrés. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel JMP Statistical Discovery v13.2 (USA).

Tableau 5 : Matrice des expériences générées par le model CCD

	Modèle	Temps (h)	Température (°C)	Présure		CaCl ₂	
				Mg / L	Mg / 100 ml	Mg/L	Mg/ml
1	+--+	3	20	600	60	0	0
2	-+++	1	60	600	60	0	0
3	0A00	2	60	350	35	125	12.5
4	----+	1	20	600	60	250	25
5	0000	2	40	350	35	125	12.5
6	++--	3	60	100	10	0	0
7	++++	3	20	600	60	250	25
8	+---	3	20	100	10	0	0
9	-+--	1	60	100	10	0	0
10	-+++	1	60	600	60	250	25
11	-+++	1	60	100	10	250	25
12	A000	3	40	350	35	125	12.5
13	----+	1	20	100	10	250	25
14	000A	2	40	350	35	250	25
15	0000	2	40	350	35	125	12.5
16	000a	2	40	350	35	0	0
17	00a0	2	40	100	10	125	12.5
18	0a00	2	20	350	35	125	12.5
19	---+	1	20	600	60	0	0
20	++++	3	60	100	10	250	25
21	+++--	3	60	600	60	0	0
22	----	1	20	100	10	0	0
23	+---+	3	20	100	10	250	25
24	a000	1	40	350	35	125	12.5
25	++++	3	60	600	60	250	25
26	00A0	2	40	600	60	125	12.5

Etude expérimentale

3.3. Filtration et égouttage

Après coagulation, les contenus des flacons ont été découpé en plusieurs morceaux à l'aide d'un couteau, et l'enlèvement de caillé a été réalisé à l'aide d'une spatule et puis le mettre dans un égouttoir recouvert par une bande a gaz pour assurer l'élimination de lactosérum et garder que le caillé (figure 13).

Au cours de cette étape le caillé est récupéré par filtration en utilisant un tissu fin (bande à gaz). L'égouttage du caillé se fait de façon manuellement, avec un léger pressage, il permet l'élimination progressive de lactosérum restant.

L'égouttage conduit à l'obtention d'une masse du caillé dont l'extrait sec est plus ou moins concentré.

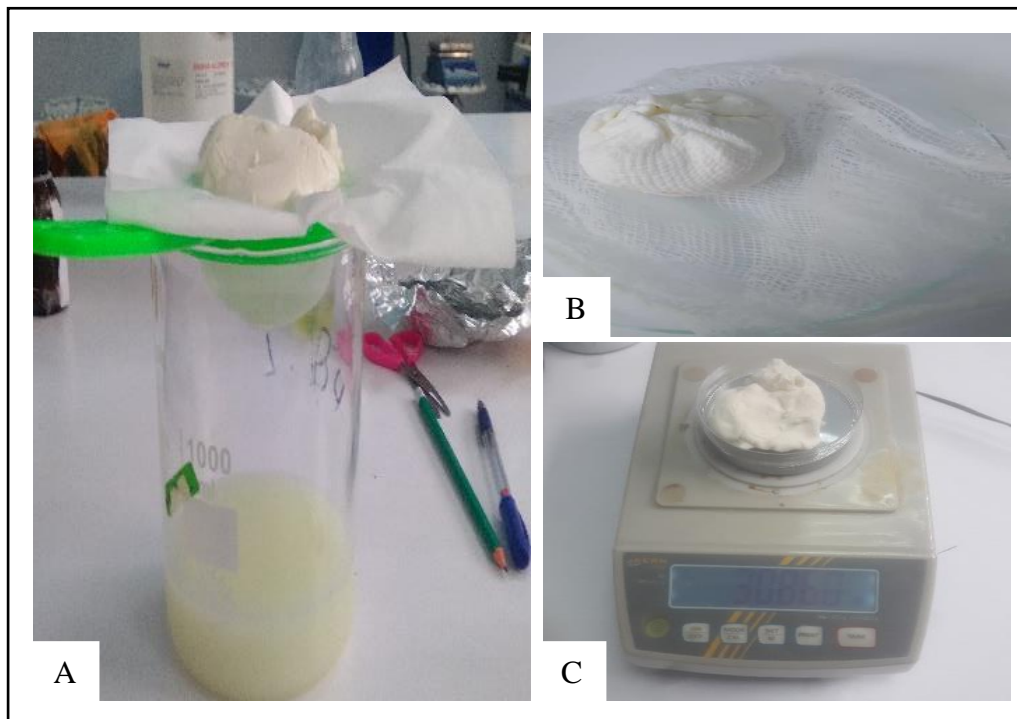


Figure 14 : L'étape de Filtration et égouttage,
(A) : égouttage, (B) : le caillé séparé, (C) : mesurage de rendement.

Etude expérimentale

3.4. Le moulage

On fait le moulage pour donner une forme au fromage. Après l'égouttage pendant 2 heures on met le fromage dans un moule rond et on applique une pression pour assurer que le fromage prend la forme de moule (Figure 14).



Figure 15 : Le fromage fabriqué après le moulage

Etude expérimentale

Les différentes étapes de fabrication de fromage frais au lait de chèvre 'Jben' sont résumées dans la figure 15.

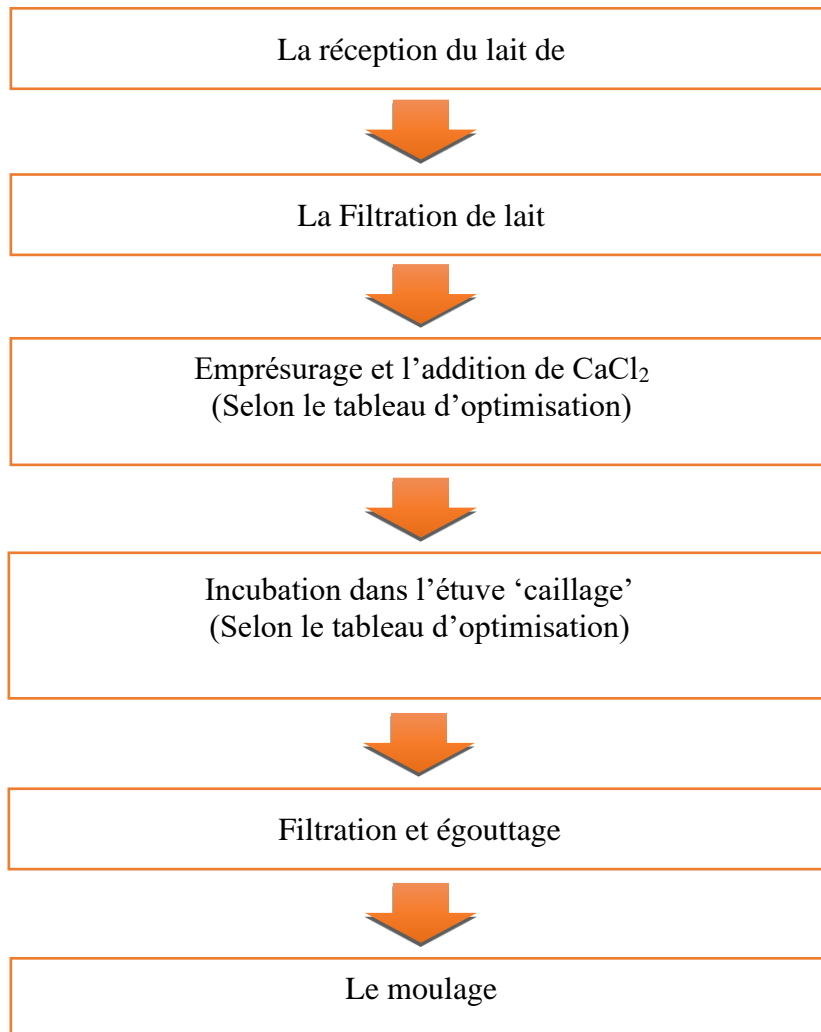


Figure 16 : Diagramme représente les différentes étapes de la fabrication du fromage Jben

4. L'isolement des champignons à partir du Jben

Dans notre étude, nous avons opté une étape pour isoler et identifier les champignons du fromage Jben : la mise en culture (Lecture ; Aspect microscopique, Aspect macroscopique)

A partir des dilutions décimales du Jben dans l'eau physiologique, 1 ml de chaque dilution a été ensemencé en surface sur milieu PDA et Sabouraud.

Toutes les boîtes ensemencées sont ensuite incubées dans une étuve à 28°C pendant cinq jours (**Chabasse et al., 1999**).

4.1. Repiquage et purification

A partir de chaque boîte, on prend une petite partie de mycélium et la met dans un tube à eau physiologique stérile, après homogénéisation de la solution à l'aide d'un vortex on prend une goutte et on l'ensemencé sur la même gélose à nouveau et on incube dans les mêmes conditions.

4.2. Identification des champignons isolés

L'identification des champignons filamenteux est généralement basée sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

4.2.1. Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique est basée sur l'observation de critères morphologiques : couleur au recto et au verso de la colonie, texture (poudreuse, cotonneuse, plus ou moins aérienne), taille ainsi que sur le délai de pousse et la température d'incubation optimale pour sa croissance. Ces derniers éléments sont d'ailleurs d'excellents marqueurs initiaux d'orientation.

Le type des milieux de cultures à ensemencer est fonction du type de moisissures attendu (et donc du type de prélèvements) et peut également participer à l'identification (**Marion et al., 2021**).

4.2.2. Analyse microscopique

L'analyse microscopique se fait après la culture sur lamelle après apposition d'un morceau de ruban adhésif (technique du drapeau) directement sur le mycélium et observation entre lame et lamelle. Une observation aux grossissements x 4, x 10, x 100 est nécessaire (**Marion et al., 2021**).

Etude expérimentale

L'ouverture des boîtes de culture s'effectue toujours sous hotte microbiologique et est refermé dès que possible. Ceci permet d'éviter les contaminations des autres milieux de culture et protéger également l'opérateur de l'inhalation d'une grande quantité de spores fongiques (Marion et al., 2021).

Les caractéristiques microscopiques à étudier sont représentées dans la figure 16, Il s'agit de : l'aspect des filaments (ou hyphes) qui constituent le mycélium (également appelé thalle) : hyphes septés (cloisonnés) ou non septés, mélanisés ou non, larges ou fins, à bords parallèles ou plutôt froissés (en ruban) et la présence de ramifications (quantité, angle de séparation des filaments, disposition des embranchements) (Marion et al., 2021).

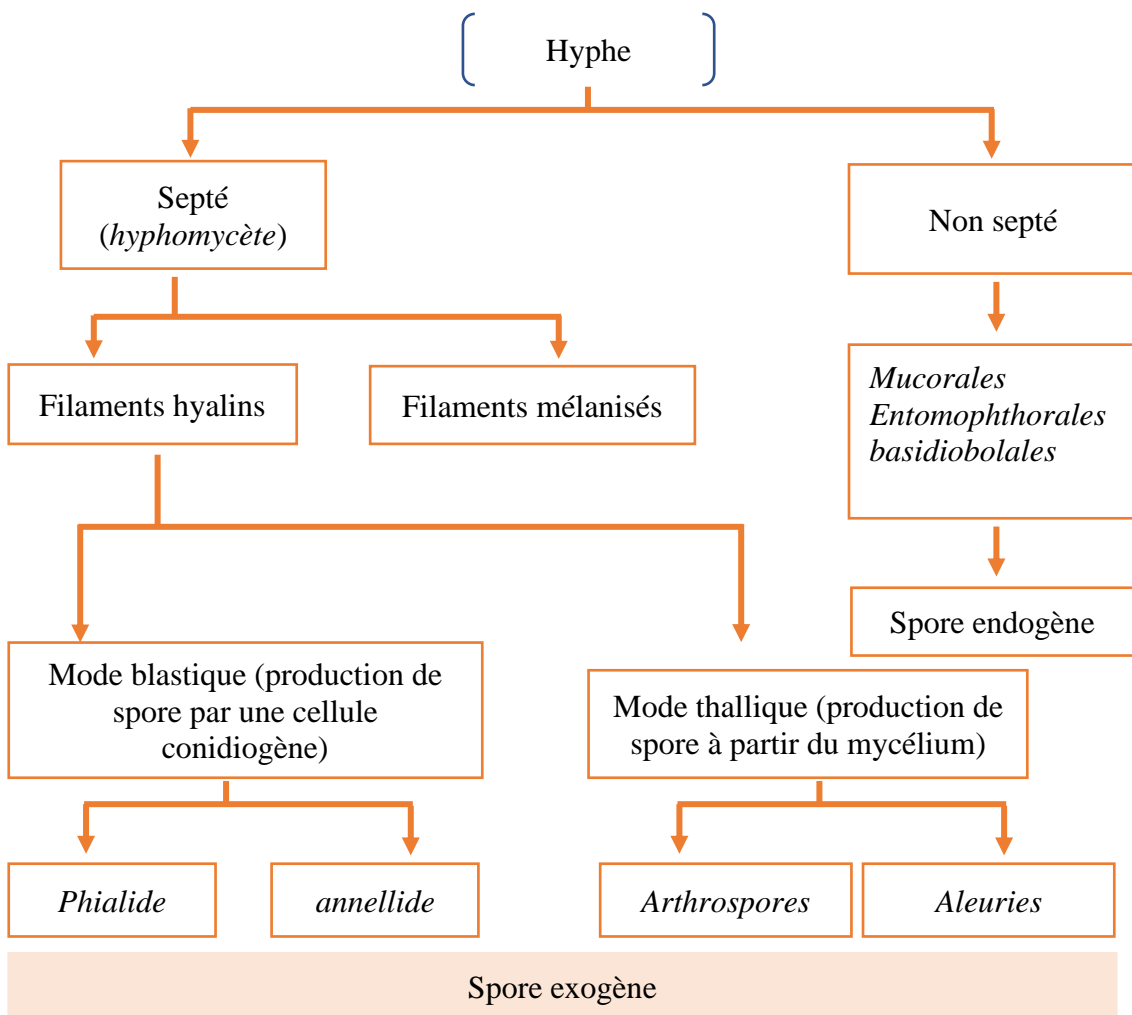


Figure 17 : Clés d'identification morphologique simplifiée des champignons filamenteux (Marion et al., 2021).

Etude expérimentale

5. Etude de l'activité antibactérienne

5.1. Préparation de la suspension mycélienne

A l'aide d'une lame bistouri stérile, on coupe un cadre de 1 cm³ de gélose, puis transférer au sein des tubes de 10 ml de bouillon PDA/Sabouraud. Les cultures sont incubées 28°C exactement, pendant 5 jours (figure 17).

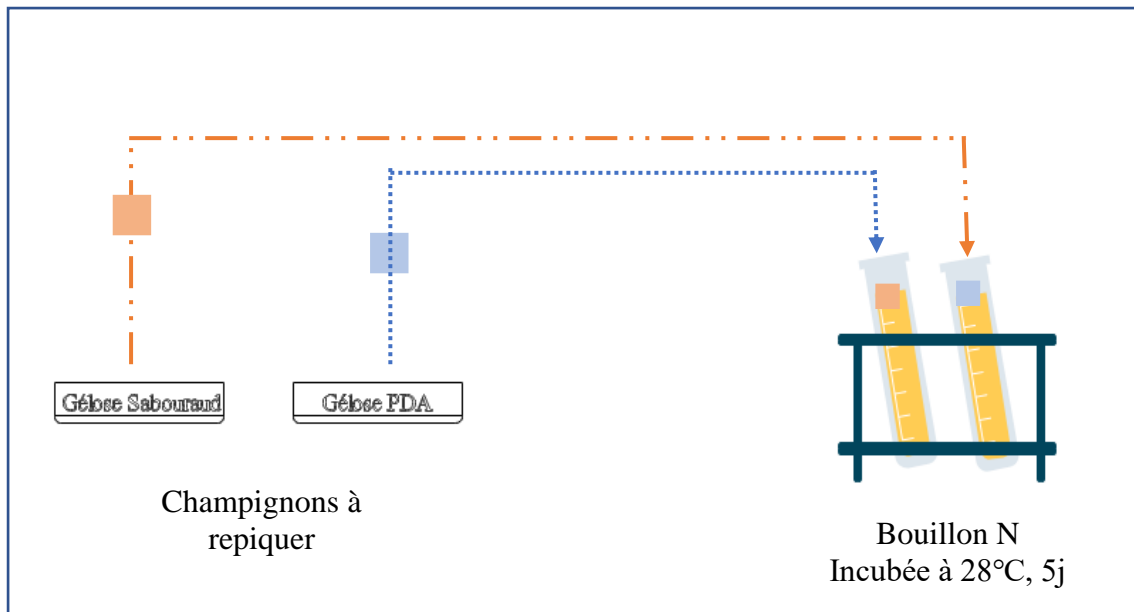


Figure 18 : Schéma représentatif d'un repiquage de champignon isolé dans le bouillon nutritif

5.1.1. Vérification de la pureté des cultures de mycélium

Après la période d'incubation des cultures en bouillon (milieu liquide) de 5 jours, la pureté des cultures liquides est vérifiée, pour les deux souches obtenues préalablement, en transférant du mycélium sur des boîtes de Pétri contenant des milieux PDA et Sabouraud à l'aide d'une anse de platine stérile. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 5 jours à 28°C et la pureté est vérifiée à l'issue de cette période d'incubation.

5.2. Préparation de surnageant de culture

Après 5 jours de culture des champignons, le bouillon obtenu est centrifugé pendant 30 minutes à 5000 g. Un second cycle de 15 minutes à 5000 g est réalisé dans le cas nécessaire. Le surnageant est alors récupéré et stérilisé à l'aide d'un filtre millipore ($\text{Ø}=0.22\mu\text{m}$). 2 ml de suspension de surnageant de culture sont transférés au sein d'un tube Eppendorf stérile, et conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation (figure 18).

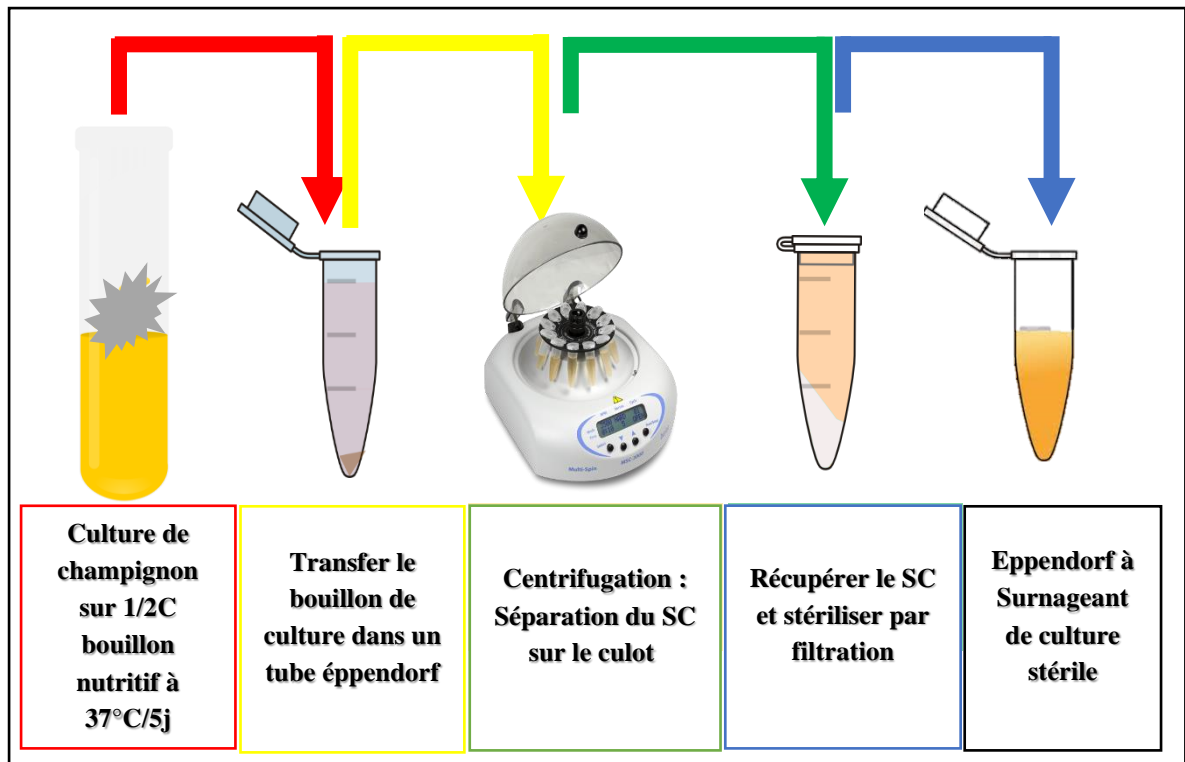


Figure 19 : Schéma représentatif des différentes étapes de la préparation du surnageant de culture (SC).

5.3. Test d'antibiogramme

5.3.1. Méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce « embu bleu stérile » sur la gélose Mueller Hinton inoculé par la souche cible. Puis, une goutte de gélose MH est déposée dans le fond de chaque puits. Chaque boîte de pétri estensemencée préalablement par écouvillonnage avec une suspension bactérienne standardisée à 0,5 McFarland.

Les puits sont ensuite remplis avec 50 μ l du surnageant de culture. Les boîtes de Petri sont laissées à +4°C pendant 15min pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne, et incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24 h d'incubation (figure 19) (Belarbi, 2011).

Etude expérimentale

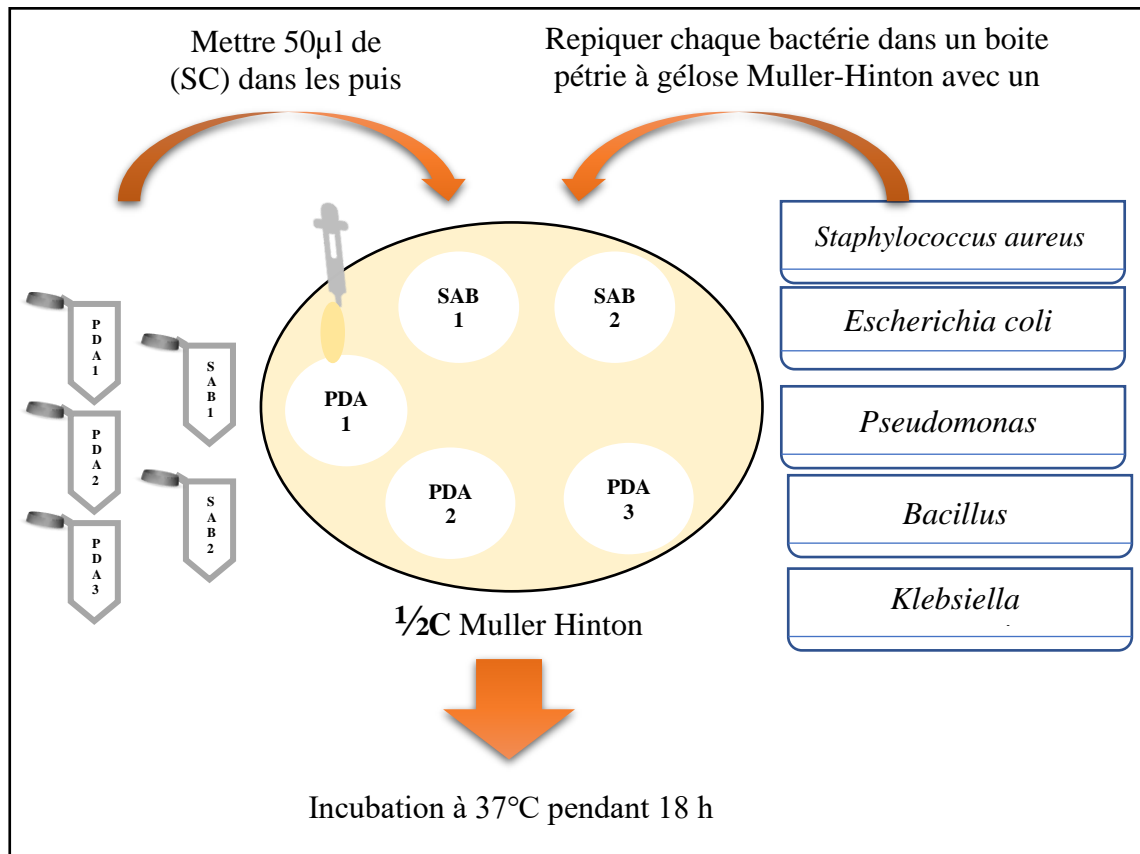


Figure 20 : Schéma représentatif du test d'antibiogramme par méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983 (Harding et Shaw, 1990).

5.3.2. Méthode de diffusion en milieu solide

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (milieu Muller- Hinton) pour l'activité antibactérienne. De ce fait, chacun des disques de papier Wattman stérile de diamètre approximativement 6 mm est imprégné par 20 µl de chaque surnageant de culture et placé à la surface du milieu de la boîte de pétri en présence des disques imbibés par l'eau physiologique stérile comme un témoin négatif, et des disques d'ampicilline commercialisé (à 20µg/ disque) comme témoins positifs. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 h dans l'étuve (figure 20).

Etude expérimentale

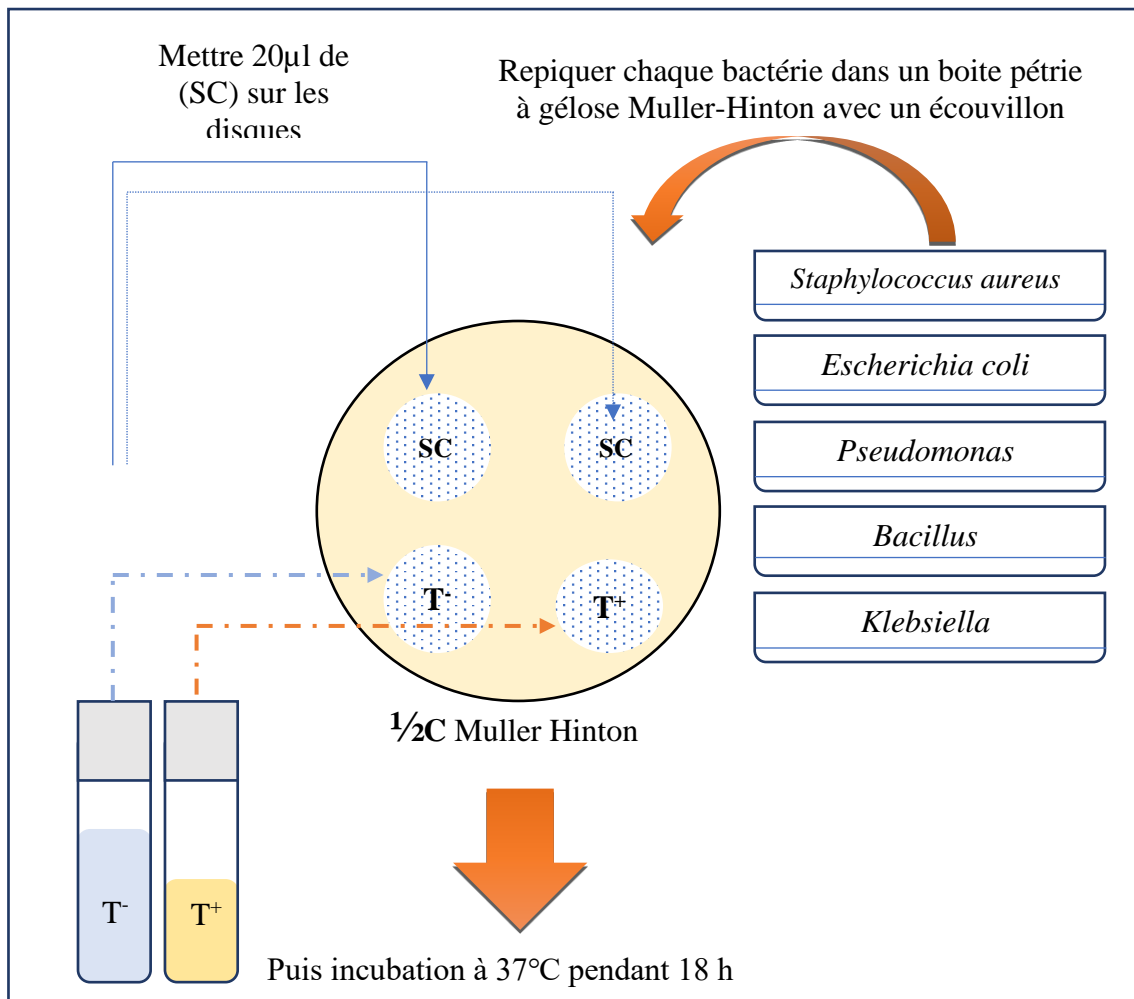


Figure 21 : Test d'antibiogramme par Méthode de diffusion en milieu solide (Balouiri et al., 2016).

A large decorative floral wreath framing the text, composed of the same fan-shaped floral motif and symmetrical branches of leaves and berries seen in the top border, forming a complete circular frame around the central text.

Résultats
et
Discussion



Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Résultats de l'optimisation des conditions de coagulation

26 essais de fabrication du fromage traditionnel (Jben) ont été réalisés en utilisant coagulant d'origine animal (caillette du jeune ruminant). Les résultats de rendement de coagulation sont résumés dans le tableau 06

Dans notre étude, le plan central composite a été utilisé pour optimiser les rendements de coagulation du lait de chèvre (**Y1**) ainsi que le pH final du fromage (**Y2**). Pour les deux réponses, les effets et les interactions entre les facteurs indépendants ; le temps (**X1**), la température (**X2**), le taux d'emprésurage (**X3**), et la masse de CaCl₂ ajoutée (**X4**) ont été déterminés. La construction de la matrice expérimentale nous a donné 26 essais.

Tableau 6 : Résultats d'ajustement du model et l'effet des variables explicatives sur les réponses.

Source	Rendement (Y ₁)		pH (Y ₂)	
	Estimate	p-value	Estimate	p-value
Intercept	12.82	<.0001*	7.013	<.0001*
X₁	0.79	0.05	-0.06	0.1062
X₂	0.31	0.41	0.18	0.0005*
X₃	3.08	<.0001*	-0.09	0.0316*
X₄	3.21	<.0001*	-0.12	0.0088*
X₁X₂	-0.76	0.08	-0.31	<.0001*
X₁X₃	0.15	0.70	0.003	0.9261
X₂X₃	0.52	0.21	0.015	0.7115
X₁X₄	0.31	0.44	-0.05	0.2319
X₂X₄	0.44	0.29	0.018	0.6444
X₃X₄	2.84	<.0001*	-0.011	0.7811
X₁²	0.85	0.40	-0.040	0.6898
X₂²	-7.15	<.0001*	-0.26	0.0231*
X₃²	-1.53	0.14	0.0045	0.9643
X₄²	-0.96	0.34	-0.075	0.4608
Model	<.0001*		0.0003*	
Manque d'ajustement	0.312		0.324	
R²	0.97		0.92	

Selon le tableau 6, on observe un effet hautement significatif pour les deux réponses étudiées avec des p valeurs 0,0001 et 0,0003 pour Y₁ et Y₂ respectivement. De plus le test de manque d'ajustement non significatif pour les deux réponses (0.312et 0.324 pour Y1 et Y2 respectivement) indique un bon ajustement du modèle avec les paramètres étudiés.

Résultats et discussion

Par ailleurs, une bonne corrélation entre les valeurs réelles et prédites est observée pour les deux réponses avec $R = 0.97$ et 0.92 pour $Y1$ et $Y2$ successivement.

Les facteurs linéaires $X3$ et $X4$ ayant un effet hautement significatif sur les deux réponses, de plus la température exerce un effet linéaire hautement significatif sur le pH final du fromage ($p=0,0005$).

D'autre part, l'interaction entre le temps et la température ; et entre le taux d'emprésurage et la masse ajoutée de CaCl_2 ayant un effet hautement significatif sur le pH et le rendement de coagulation avec des p valeur inférieures à $0,0001$.

En terme quadratique, la température est le seul facteur indépendant qui a un effet significatif sur le pH ($p<0.05$) et hautement significatif sur le rendement de coagulation ($p<0.0001$).

1.1.1. Etude des surfaces de réponses

La régression multiple des équations polynomiales quadratiques abouties à l'élaboration des surfaces de réponse (Figure 21).

A partir de la figure 21 (a) on observe un effet généralement positif du temps et température sur le rendement de coagulation, qui atteint son maximum à 3 heures et 40°C , après ce point une diminution de rendement est remarquée avec l'augmentation de la température.

D'autre part, un effet positif synergique de taux d'emprésurage et l'ajout de sel sur le rendement qui aboutit le max avec les niveaux maximal de chaque variable.

Le pH du fromage étudié est toujours situé dans l'intervalle de neutralité en concordance avec le temps et la température. En revanche un excès d'emprésurage et/ou d'ajout du CaCl_2 semble ayant un effet négatif (diminution significatif) sur le pH final du fromage (Figure 21 (b)).

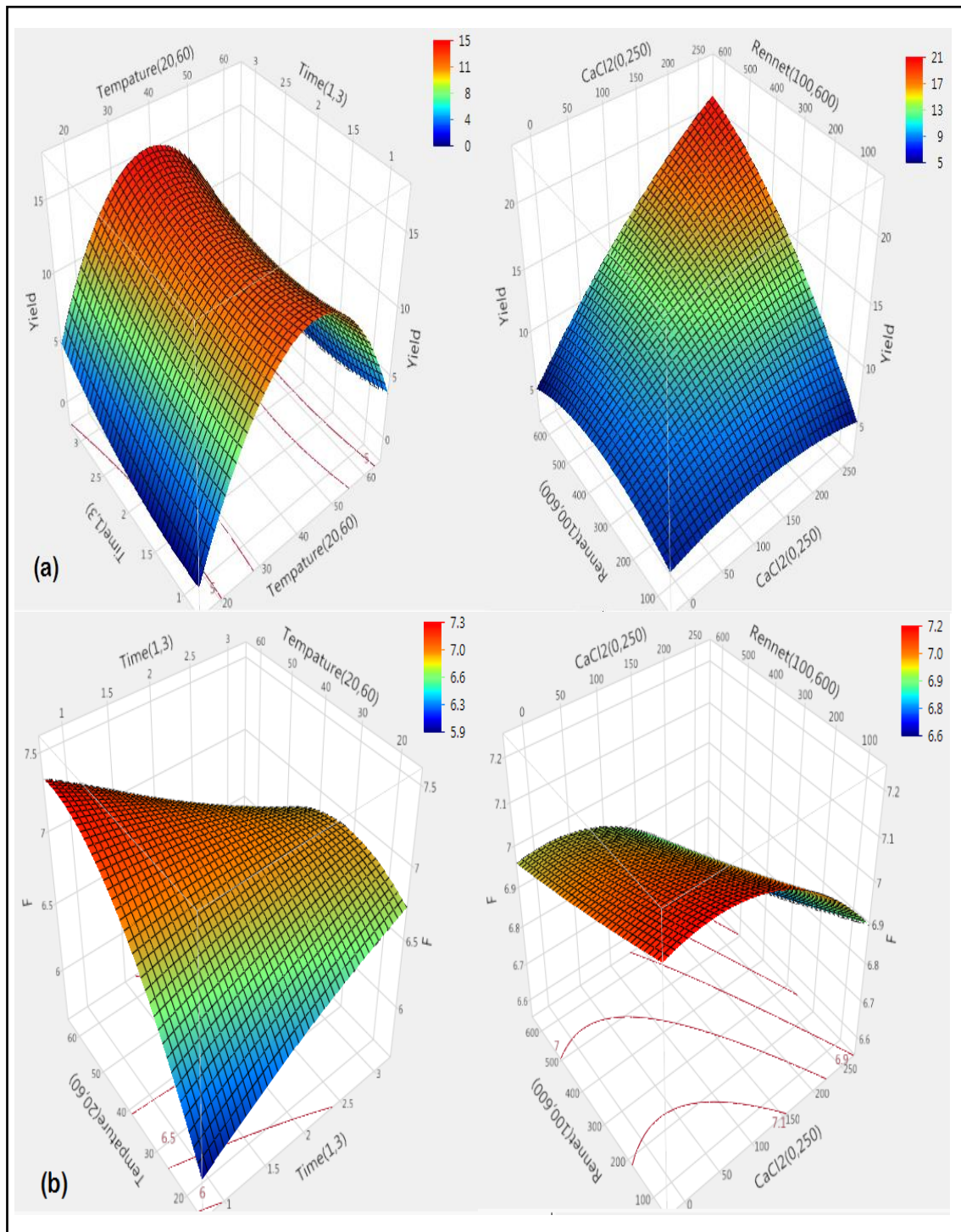


Figure 22 : Représentation tridimensionnelle des modèles polynomiales de deuxième ordre. (a) : Rendement de coagulation, (b) : pH final du fromage.

Résultats et discussion

1.2. Identification morphologique des champignons

L'approche classique d'identification des moisissures repose sur l'analyse macroscopique et microscopique des colonies obtenues en culture.

1.2.1. Analyse macroscopique

Lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons isolés, le seul aspect de l'appareil végétatif a été observés (figure 22-23) :

- L'aspect : duveteuses
- Le relief (Aspet verso) : Plat.
- La taille : Envahissante.
- La couleur : Blanche
- Mycélium : Etroite, extensif.
- Présence des pigments blanche diffusant dans la gélose
- Vitesse de la pousse des colonies Rapide +++
- La température de développement 28°C.
- Pycnides : formations globuleuses, colorées.

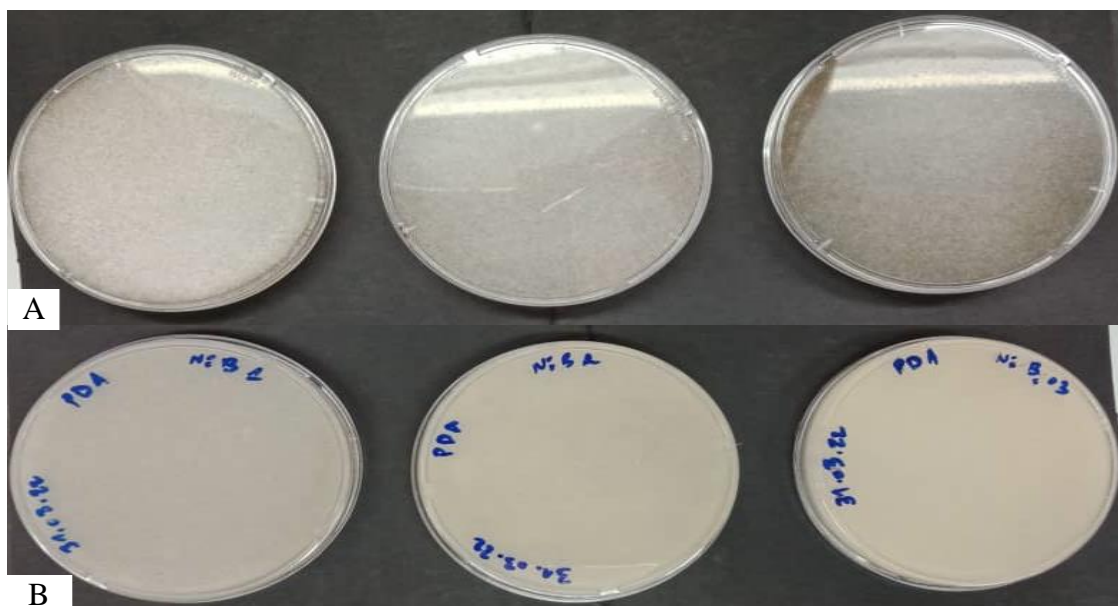


Figure 23 : Observation macroscopique du champignon *Phoma* sp. isolé à partir de jben
Culture sur le milieu PDA

Résultats et discussion

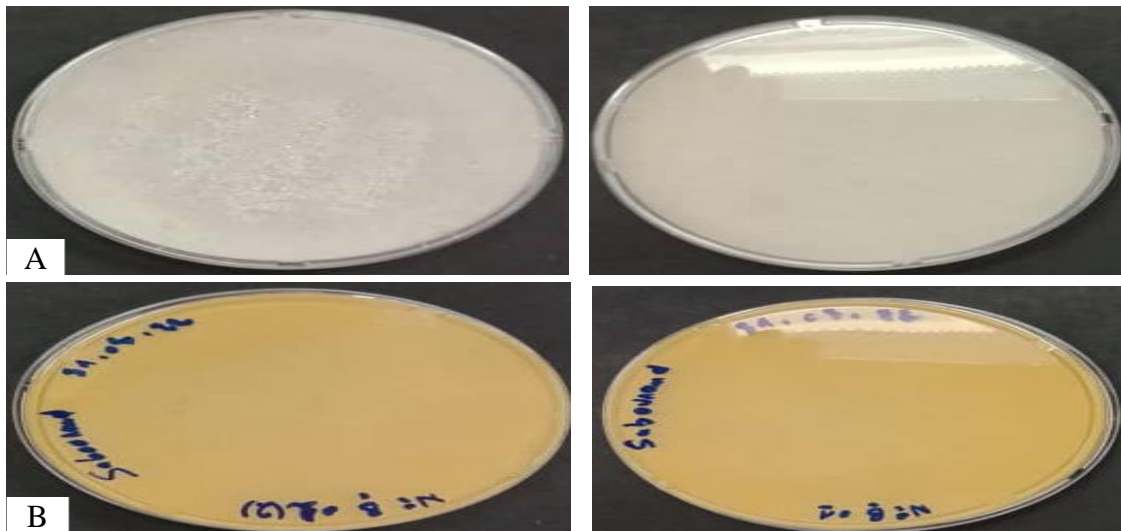


Figure 24 : Observation macroscopique du champignon *Phoma* sp. Isolé à partir de jben
Culture sur milieu Sabouraud.

1.2.2. Analyse microscopique

L'analyse microscopique se fait par observation au grossissement x 4 puis x 10, puis x100. Les figures 24-26 représentent l'aspect microscopique du champignon isolé.

- ✓ **Le thalle végétatif**
 - Cloisonné (septé)
 - Filaments peu ramifiés,
 - Diamètre étroit (< 2 μm) et régulier
 - Paroi pigmentée (mélanisée).
- ✓ **Les organes de fructifications**
 - Présence d'organes protecteurs des Conidies.
 - Modes de formation des conidies (issues directement du thalle, solitaires) (aleuriospores).
- ✓ **Les spores**
 - Endogènes (endospores)
 - L'aspect des spores [amérospores (unicellulaires et de petite taille).

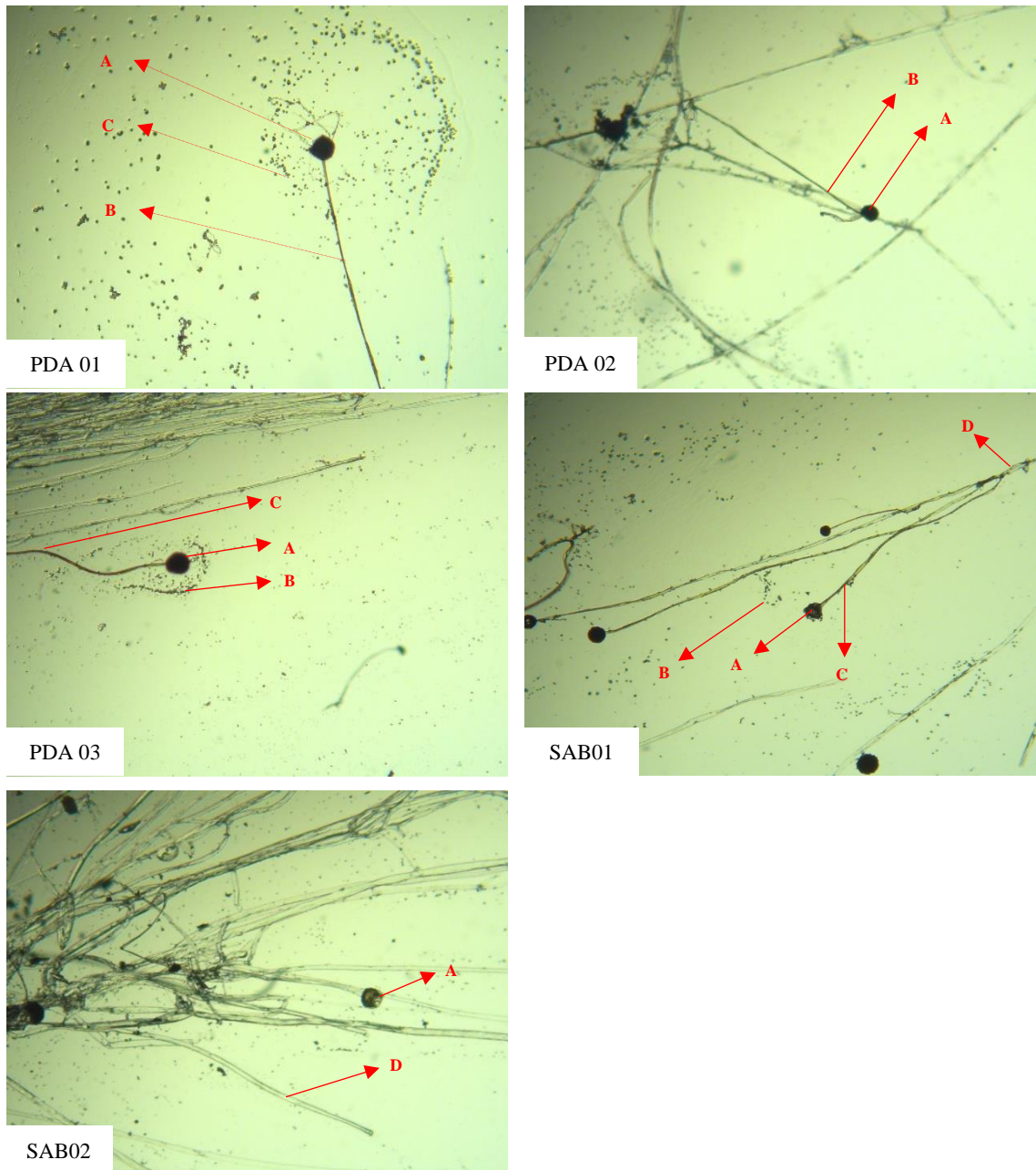


Figure 25 : Observation microscopique du champignon à l'objectif x 04.

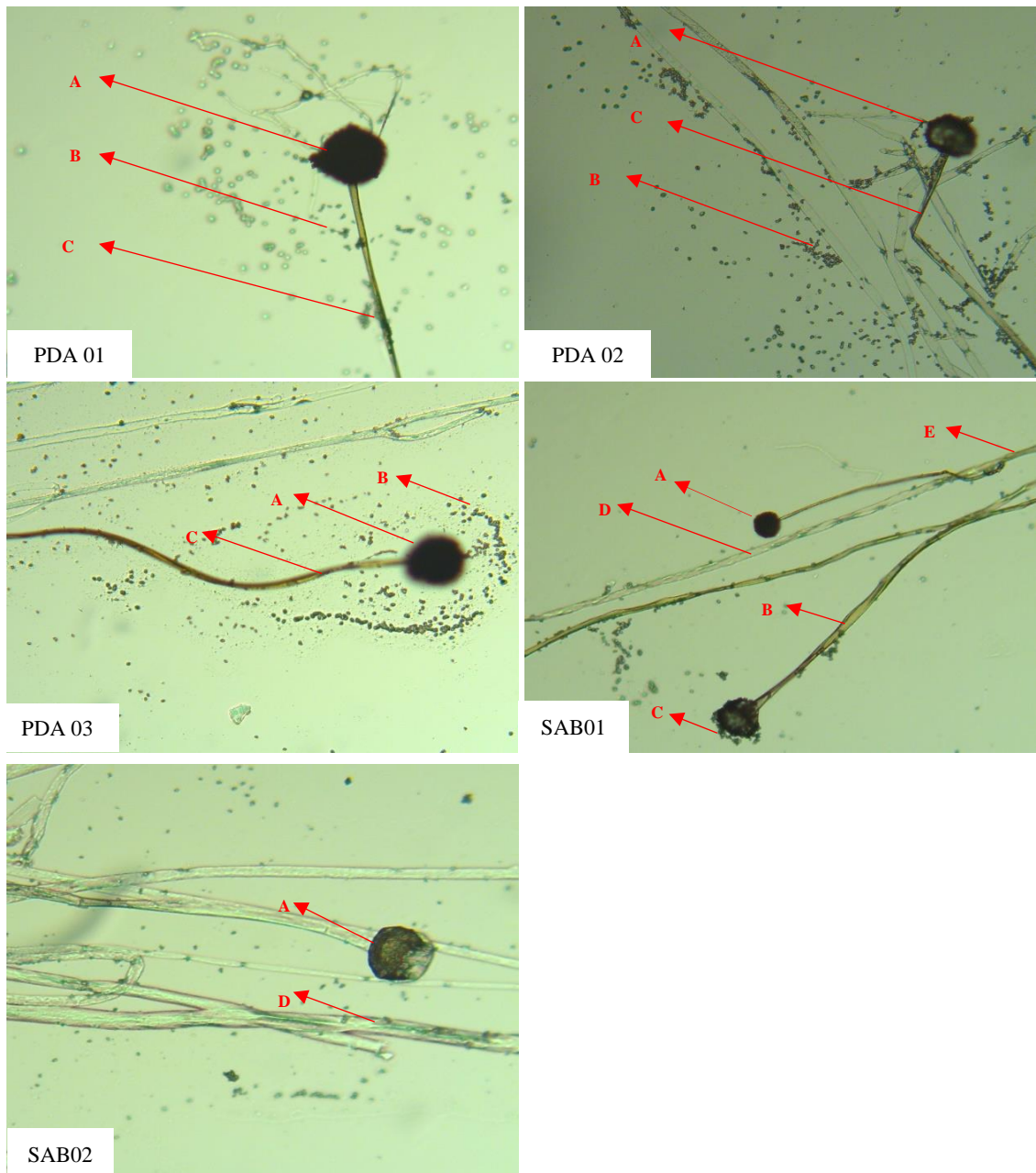


Figure 26 : Observation microscopique du champignon à l'objectif x 10.

Résultats et discussion

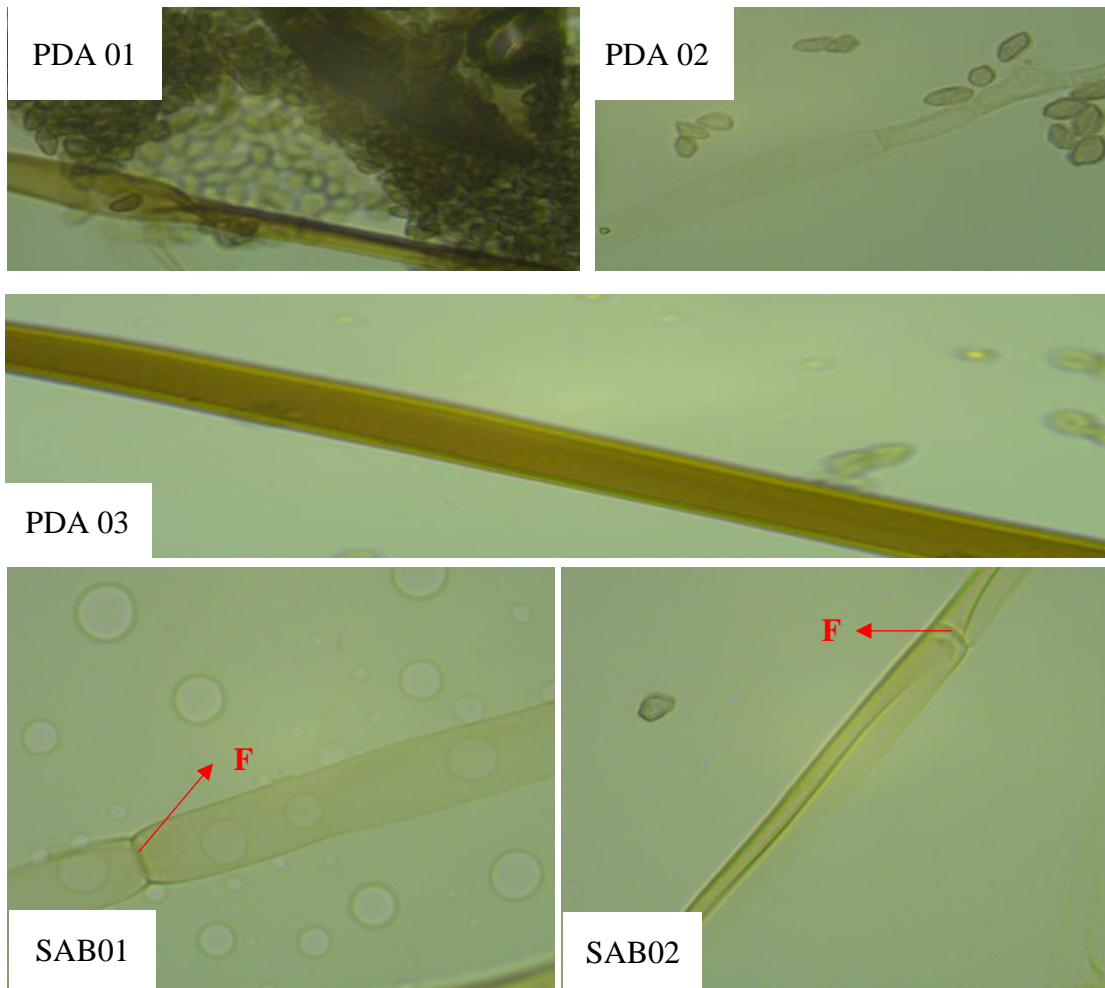


Figure 27 : Observation microscopique du champignon à l'objectif x 100.

Résultats et discussion

1.2.3. Classification

Selon les caractères microscopiques et macroscopiques (figure 27) de *Chabasse et al. (2002)* et *Vargas et al. (2009)* le champignon isolé appartient au genre *Phoma* sous la classification suivante :

Règne : *Fungi*.

Division : *Deuteromycotina*.

Ordre : *Sphaeropsidales*.

Famille : *Sphaerioidaceae*.

Genre : *Phoma* sp.

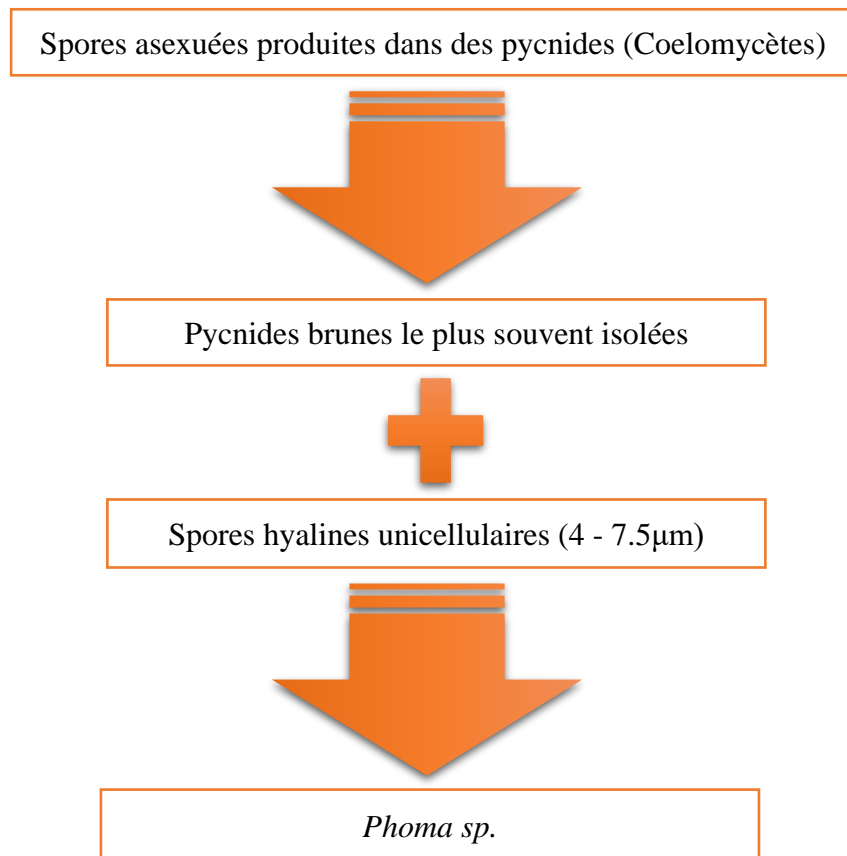


Figure 28 : Diagramme représente le différents caractères d'identification du *Phoma* sp.

Résultats et discussion

1.3. Etude de l'activité antibactérienne de champignon

1.3.1. Méthode de puis

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des champignons isolés par la méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits) n'a donné aucun résultat positif observable (figure 28). Cela est probablement lié à une faible diffusion de l'extrait des champignons (SC) en milieu solide, ou à une concentration faible des molécules bioactive de ce champignon.



Figure 29 : Résultats de tests des puits (Méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983) d'antibiogramme sur les bactéries : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *S. aureus*, et *K. pneumoniae*

Résultats et discussion

1.3.2. Méthode de disques

Les mêmes résultats de l'absence de l'activité antimicrobienne du champignon isolé par la méthode de puits sont observés avec la méthode de diffusion en milieu solide (Figures 28-32) ce qui confirme le résultat précédent

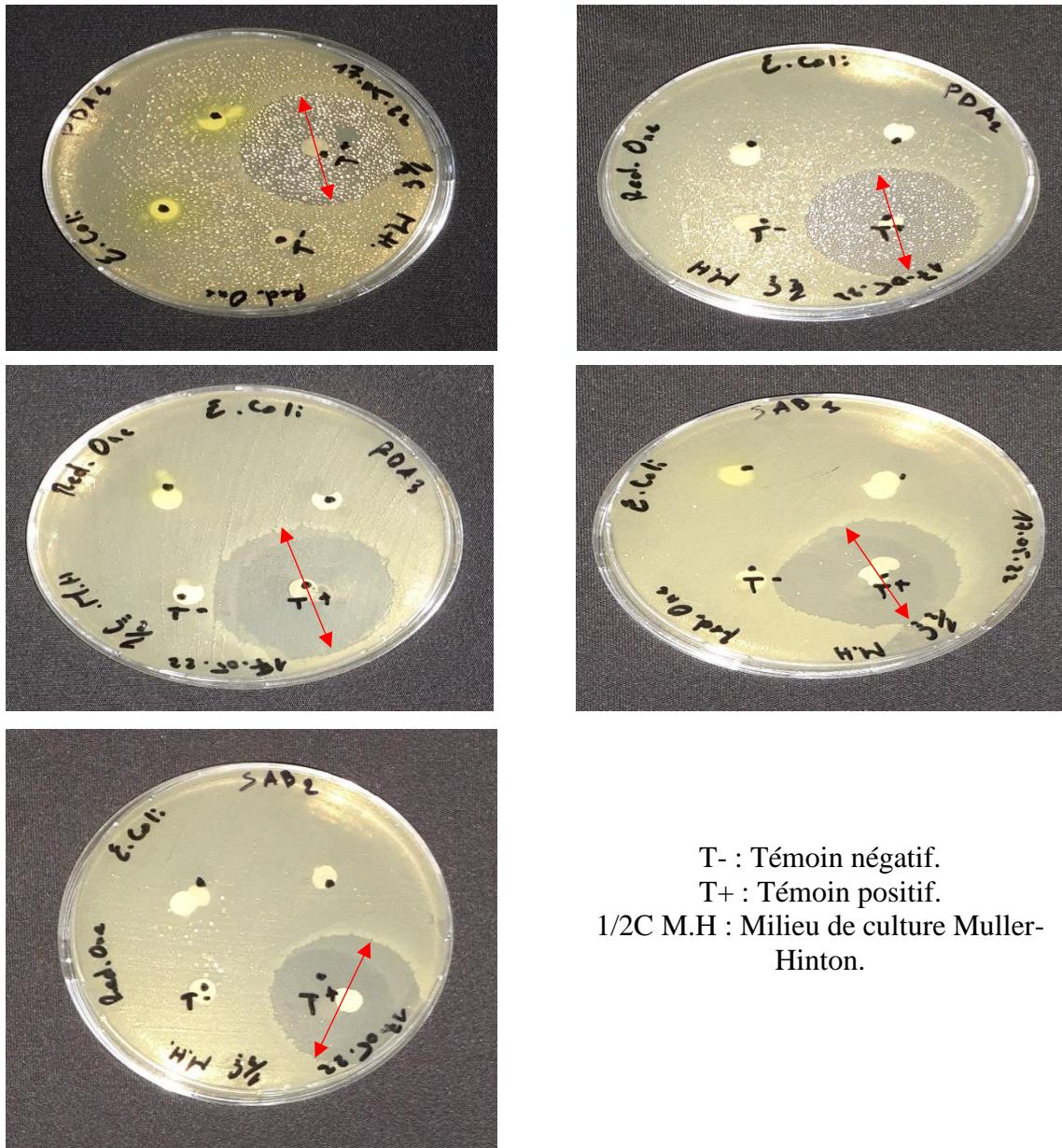
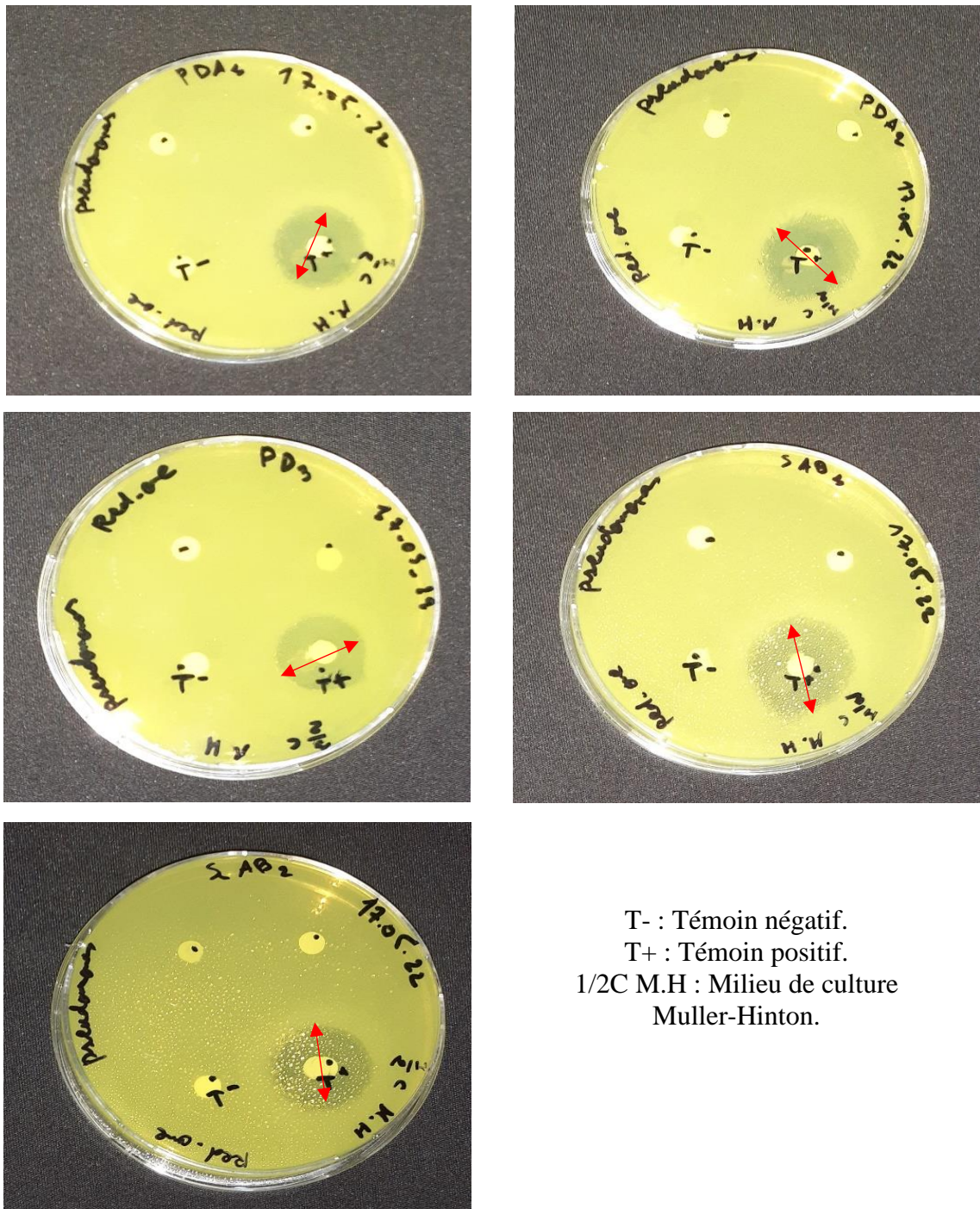


Figure 30 : Résultats de test des disques d'antibiogramme sur la bactérie *E. coli*.

Résultats et discussion



T- : Témoin négatif.
T+ : Témoin positif.
1/2C M.H : Milieu de culture
Muller-Hinton.

Figure 31 : Résultats de test des disques d'antibiogramme sur la bactérie *Pseudomonas*.

Résultats et discussion

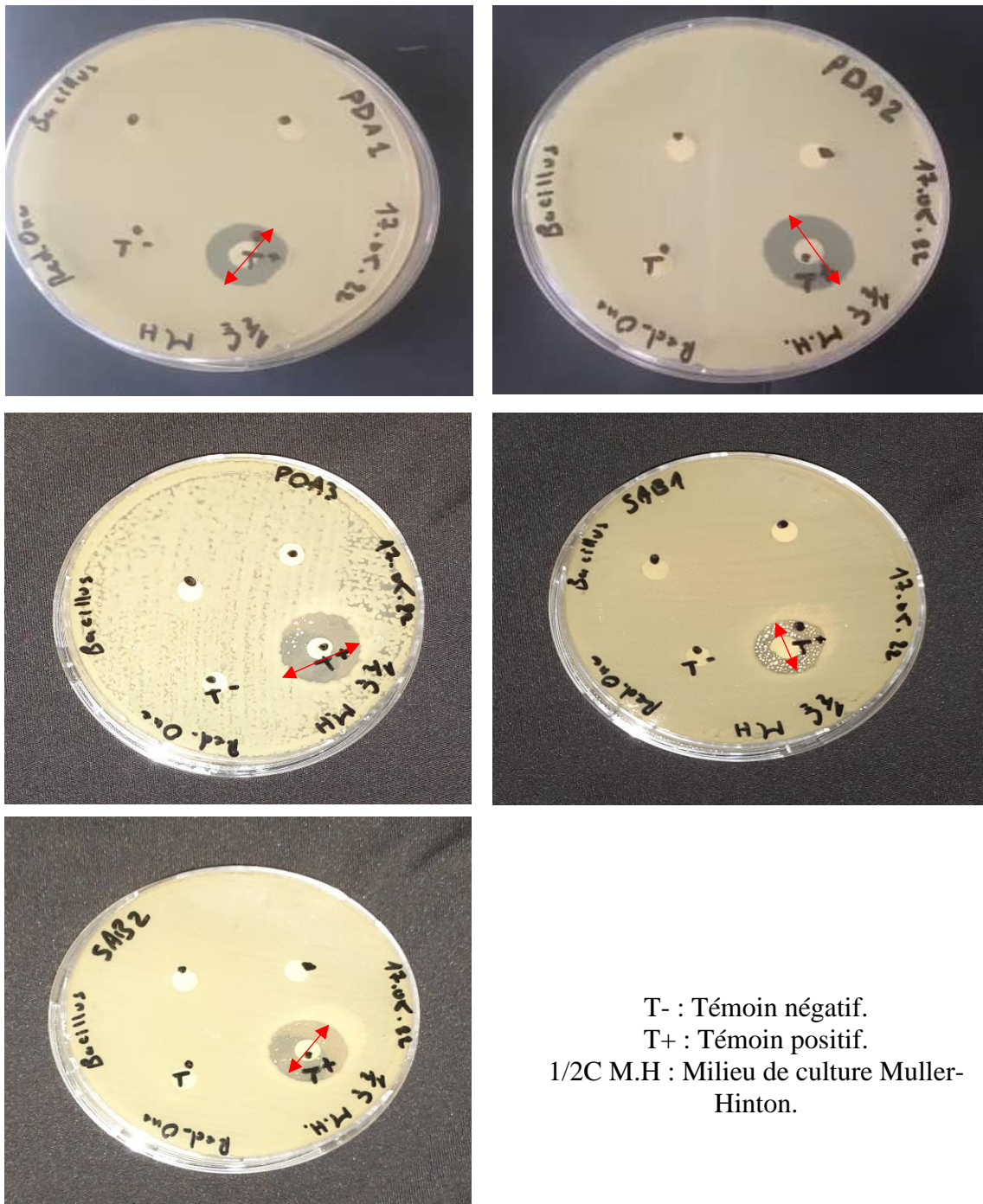


Figure 32 : Résultats de test de disques d'antibiogramme sur la bactérie *Bacillus*.

Résultats et discussion

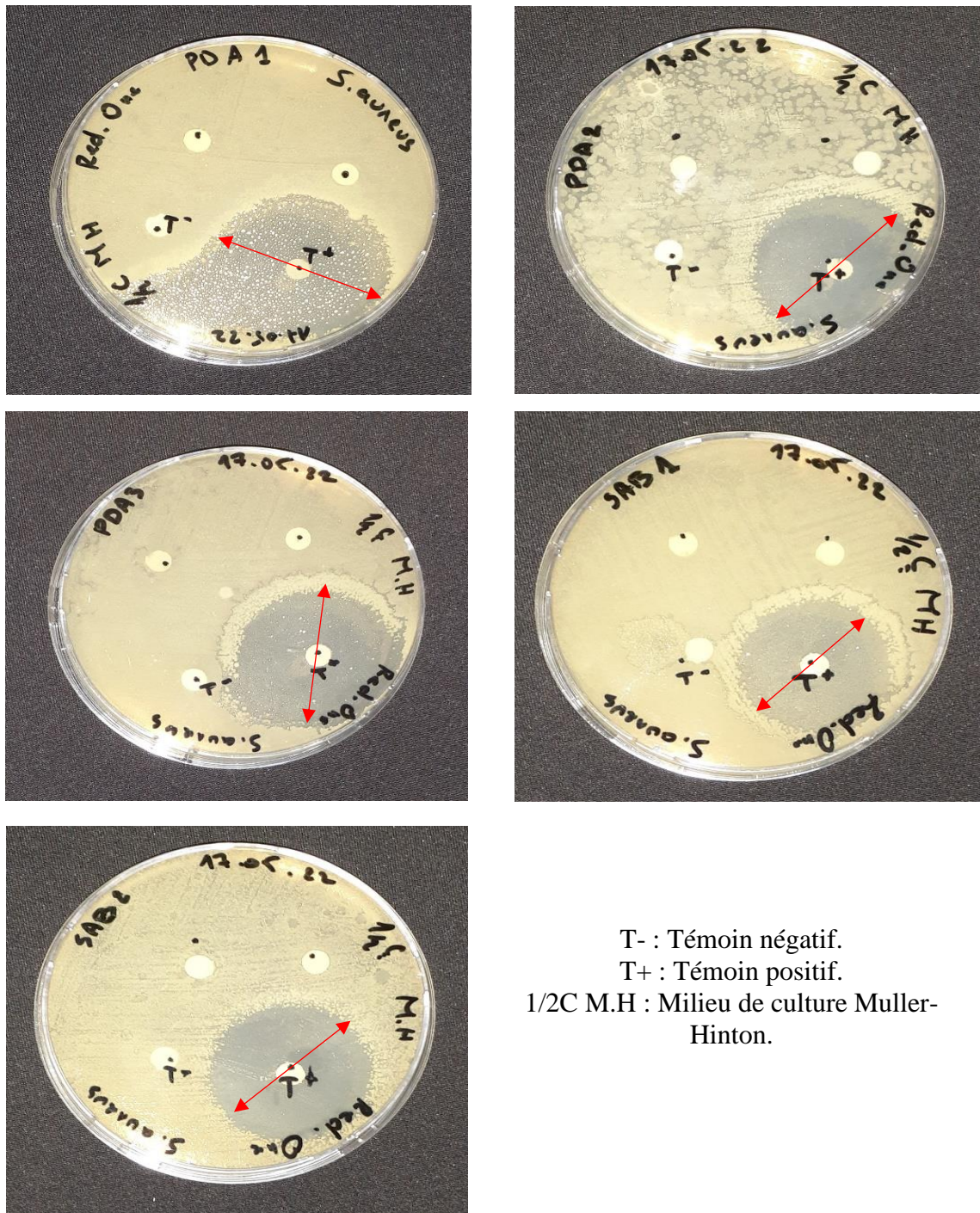
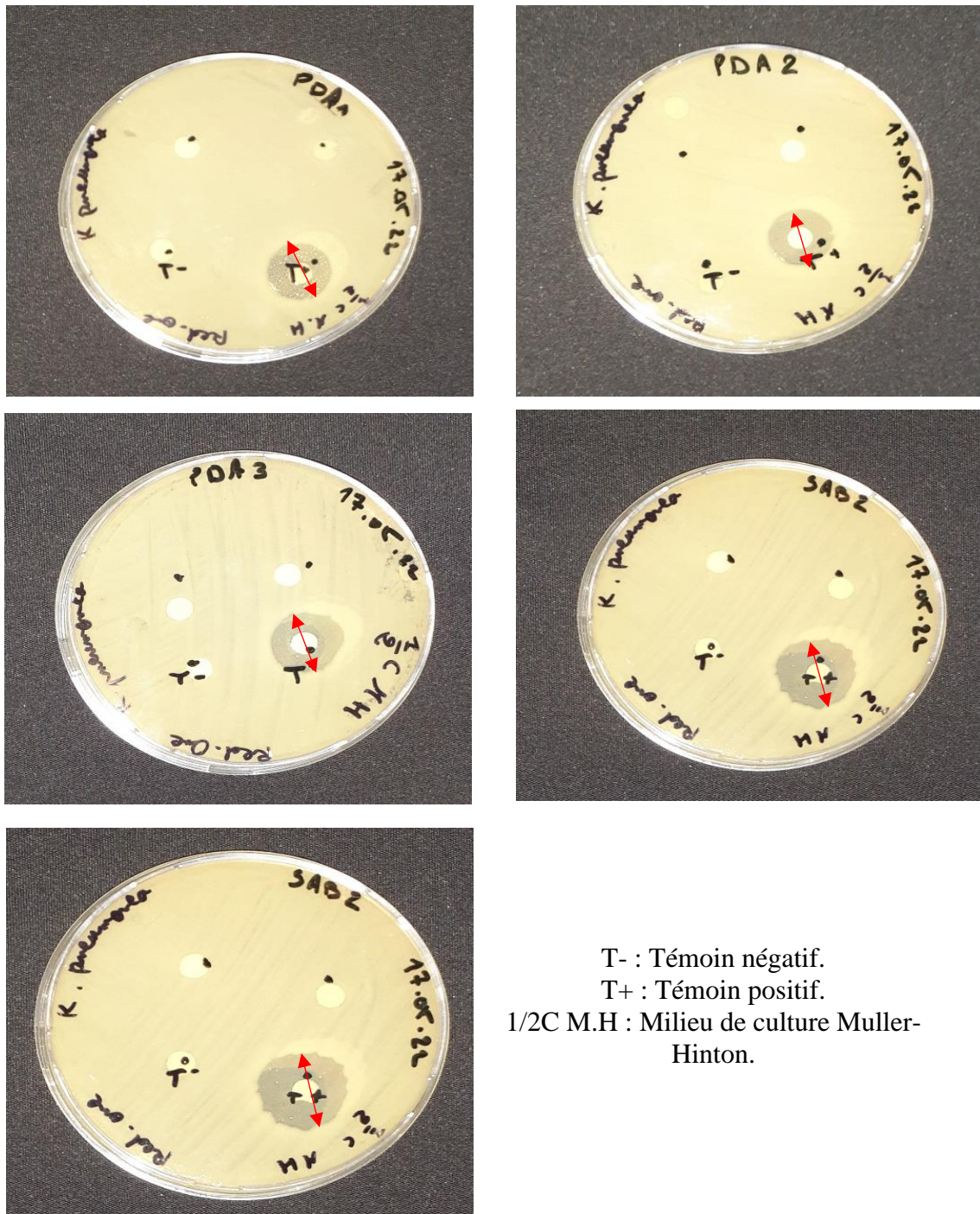


Figure 33 : Résultats de tests de disques d'antibiogramme sur la bactérie *S. aureus*.

Résultats et discussion



T- : Témoin négatif.
T+ : Témoin positif.
1/2C M.H : Milieu de culture Muller-Hinton.

Figure 34 : Résultats de test des disques d'antibiogramme sur la bactérie *K. pneumoniae*

2. Discussion

2.1. L'optimisation des conditions de coagulation

Les fromages frais obtenus après coagulation par l'action de la présure au lait cru de chèvre, possèdent des textures souples tranchable, frais à pâte blanches légèrement ferme.

Les fromages de chèvre peuvent être fabriqués selon le type de présure implique quant à elle une coagulation plus rapide, mais un niveau d'acidification plus faible (Morgane et al., 2000).

Les analyses physico-chimiques de certaines études montrent que le « Jben » est plus ou moins acide par contre notre « Jben » est neutre (pH entre 6 et 7). Les analyses microbiologiques étudiées par (référence) montre qu'il est riche en flore lactique, il contient aussi des germes de contamination fécale tels que les coliformes fécaux, et streptocoques fécaux, il contient aussi des bactéries d'altération comme Bacillus, et les levures et des moisissures.

L'optimisation via le plan central composite est plus fiable car il est moins coûteux et prend moins de temps que les méthodes traditionnelles car elle simule au mieux les phénomènes aléatoires les plus complexes, en utilisant le moins d'essais pour trouver des interactions entre les variables, donc elle s'inscrit dans la démarche constante d'amélioration de la qualité. Elle offre une grande quantité d'information à partir d'un nombre réduit d'essais.

Les rendements en fromage relatif aux différentes productions sont instables, ceci peut être dû à la variation de la composition chimique du lait de départ et de la différence de la durée, la température, contenant en présure et CaCl₂ d'une part, et à la maîtrise de bonnes pratiques de fabrication d'autre part.

Les meilleurs rendements fromagers obtenus lors de la réalisation des essais sont de 15.472g et 15.454g pour les essais 10 et 12 respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celle de l'essai 19 à 0.350 g.

L'effet de la concentration en présure sur le temps de coagulation est étudié en ajoutant au lait des quantités de présures dans les conditions variables de mesure (température et concentration en CaCl₂). L'ajout de quantités élevées de présure (60mg/100ml) donne une diminution du temps de coagulation de 3 à 1 h et des meilleurs rendements de fromage dans une température élevée (60°C). Pour le même intervalle le

Résultats et discussion

manque de concentration en CaCl_2 même la concentration en présure est élevées donne une diminution de rendements de fromage avec un temps de coagulation élevé.

2.2. Identification de champignon isolé et son activité antibactérienne

Afin de vérifier l'activité inhibitrice de champignon vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes, nous avons isolé et identifié une souche à partir d'un fromage élaboré dans le laboratoire (le fromage optimisé) type Jben. Les résultats de l'identification, selon des critères morphologiques macroscopique et microscopique, obtenus ont permis d'avoir une collection de souches représentée par un seul aspect duveteux isolé sur milieu PDA et sur milieu SABOURAUD.

L'évaluation du pouvoir antagoniste des champignons isolés a été étudié vis-à-vis 6 souches cibles, indicatrices d'altération. L'inhibition se traduit par la formation de zones claires, mais la zone claire n'a pas été formée dans aucune boîte, cela signifie qu'il ne se trouve pas une activité antibactérienne de champignon isolés (résultat négatif).

Depuis la prévalence croissante des mauvaises herbes résistantes aux herbicides et l'interdiction des herbicides, selon Chettida *et al.* (2022) et José *et al.* (2021). Le métabolite secondaire produit par *Phoma* sp. dimorpha a une activité biotechnologique élevée et peut être utiliser comme un biocontrôle contre les mauvaises herbes. L'utilisation de contrôles biologiques avec des mycoherbicides est devenue une approche innovante dans le domaine agricole. Selon Luciana *et al.* (2021), il y a une utilisation très importante dans l'élaboration de tels composés à l'aide du champignon *Phoma* sp. additionné de substrats peu coûteux. Les résidus agro-industriels ont été utilisés comme source de carbone supplémentaire dans la fermentation immergée, tels que le glycérol de l'industrie du biodiesel, la drêche de brasserie et le son de riz. Les effets de ces sources de carbone ont été évalués sur la production de composé bioémulsifiants intracellulaires (IPS) et extracellulaires (EPS), la concentration de la biomasse, le pH, la densité, la tension superficielle, l'indice d'émulsification et l'activité bioherbicide.

Selon Ku *et al.* (2022), un nouveau composé de type oxazole, appelé macrooxazole E, et trois macrooxazoles connus A-C, ont été isolés à partir d'extraits d'acétate d'éthyle de cultures de *Phoma* sp. JS0228. Le macrooxazole 'C' a montré des activités antiprolifératives modérées contre les lignées cellulaires humaines de cancer du sein et de cancer de la prostate. Cette étude présente la possibilité pour le champignon endophyte *Phoma* sp. JS0228 de produire de nouveaux composés naturels bioactifs.



Conclusion



Conclusion

Conclusion

Au cours de notre travail nous avons suivi la chaîne de fabrication du fromage frais « Jben » et isolé et identifié les champignons autochtones dans le but d'évaluer leur pouvoir antibactérien.

Notre démarche a comporté trois étapes : premièrement, l'optimisation du rendement du fromage, la deuxième étape, l'isolement des champignons à partir du Jben et l'identification des champignons, la troisième étape consiste à la préparation de surnageant de culture mycélienne et l'étude de leurs activité antibactérienne.

Ce travail nous a permis de relever les points suivants :

- Les résultats de la fabrication du fromage 'Jben' en utilisant un coagulant d'origine animal nous a permis de mettre en évidence la différence des poids de rendements obtenus selon la durée, température, contenant en présure et CaCl_2 .
- Les résultats des deux tests disques et puits ont montré que le champignon isolé à partir du fromage Jben préparé ne présente aucune activité antibactérienne à l'égard des souches de bactéries testées : *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. et *K. pneumonia*

Pour conclure, les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des meilleurs rendements en peu de temps avec des petites quantités de présure et de CaCl_2 . D'autres études seront nécessaires pour en savoir plus sur l'action des bio-conservateurs et pour résoudre des problèmes liés à la contamination des produits laitiers.

La recherche dans le domaine des bio-conservateurs, particulièrement leurs interactions avec des bactéries pathogènes mérite un programme de recherche approfondie, ce qui permettra d'éclaircir davantage ces interactions qui sont toujours très complexes.

Références bibliographiques

1. Almena-Aliste Me., et Mietton M., (2014). these classification, characterization, and categorization: a global perspective. *Microbiology spectrum*, page 2.
2. Alomar J., (2007). Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. (Doctoral dissertation, institut national polytechnique de lorraine), pages 1-94.
3. Åvall-Jääskeläinen S., Palva A., (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications, *Fems microbiology reviews*, page 511-529.
4. Bouadjaib S., (2013). Etude physico chimique du produit laitier traditionnel du sud, Qualité d'un fromage local de bas de lait de chevre. Master thesis, University Abou Beker Belkaid Telemcen Algeria, pages 1-65.
5. Benkerroum N., Tamimea Y., (2004). technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, Jben and smen) to small industrial scale. *Food microbiology*, page 399-413.
6. Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., & Thorel, M. F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 16(1), page 452-471.
7. Branger, A., Richer, M. M., & Roustel, S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Educagri editions.
8. Bryan F., L., et World Health Organization. (1994). L'analyse des risques-points critiques pour leur maîtrise : comment apprécier les risques liés à la préparation et à la conservation des aliments. Organisation mondiale de la santé, pages 1-78.
9. Benoit Patrice Et Guy Arnal, (2003). Sources et caractère enterotoxinogène des staphylocoques en élevage ovin laitier (doctoral dissertation), pages 1-51.
10. Tom P. B., et Fitzsimons N., et Brennan N., L., et Cogantim M., (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), page 259-274.
11. Belarbi F., (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériens (Doctoral Dissertation, Université d'Oran1-Ahmed ben Bella), pages 1-116

Références bibliographiques

12. Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, d. E., & Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food microbiology*, 21(5), page 579-588.
13. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), page 71-79.
14. Cahagnier, B., Dragacci, S., Frayssinet, C., Fremy, j. M., Hennebert, g. L., Lesage-Meessen, l., (1998). *Moisissures des aliments peu hydrates*. Lavoisier tec et doc, paris, page 85-88.
15. Chabasse D, Guiguen CL, Contet-Audonneau N (1999). *Mycologie médicale*. Edition Masson, Paris, pages 1-153.
16. Chabasse, D., Pihet, M., & Bouchara, J. P., (2002). Cahier de formation № 25 Bioforma biologie médicale - Les Moisissures D'intérêt Médical-. Laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU d'Angers – 4, rue Larrey, pages 1-161.
17. Srisuksam, C., Yodpanan, P., Suntivich, R., Tepboonrueng, P., Wattananukit, W., Jongsareejit, B., & Amnuaykanjanasin, A. (2022). The fungus *Phomamultirostrata* is a host-specific pathogen and a potential biocontrol agent for a broadleaf weed. *Fungal Biology*, 126(2), pages 162-173.
18. Duquenne M., (2010). Incidence de paramètres technologiques sur l'expression de gènes et la production d'entérotoxines de *Staphylococcus aureus* au cours des 72 h suivant l'emprésurage des laits en fabrication fromagère (doctoral dissertation, AgroParisTech, page 14
19. Djefal K., (2018). Optimisation des conditions de coagulation du fromage frais traditionnel « Jben », [mémoire de master, université Abbes Laghrour – Khenchela –], page 17-31.
20. Dortu C., et Thonart P., (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 13(1), page 143-154.
21. Guy F., (2006). Elaboration d'un guide méthodologique d'intervention lors de contamination par les salmonelles de produits laitiers au lait cru en zone de productions fromagères AOC du massif central (doctoral dissertation), pages 1-52

Références bibliographiques

22. Harding, D., & Shaw, E. (1990). Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(5), page 648–654.
23. Neto, J. R. C., Dossantos, M. S. N., Mazutti, M. A., Zobot, G. L., & Tres, M. V. (2021). *Phoma dimorpha* phytotoxic activity potentialization for bioherbicide production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, page 01.
24. Kieran J., Mcauliffe Olivia (2018). *Listeria monocytogenes* in foods. *Advances in food and nutrition research*, 86, 181-213.
25. Ku, H., Baek, J. Y., Kang, K. S., & Shim, S. H. (2021). A new anti-proliferative compound from an endophytic fungus, *Phoma* sp. *Natural Product Research*, page 1.
26. Kediri N. et Abderrahimrania O., (2019). Evaluation de la qualité microbiologique de quelques échantillons du fromage traditionnel (type Jben) commercialisé dans la ville de Djelfa, [Memoire De Master, Université Ziane Achour - Djelfa], pages 1-43.
27. Leuschner R. G K et Boughtflower M. P., (2002). Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* o157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars *typhimurium*, *Enteritidis*, and dublin. *Journal of food protection*, 65(3), page 508-514.
28. Luft, L., Confortin, T. C., Toderò, I., Brun, T., Ugalde, G. A., Zobot, G. L., & Mazutti, M. A. (2021). Production of bioemulsifying compounds from *Phoma dimorpha* using agroindustrial residues as additional carbon sources. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, page 35
29. Meghoufel N. L., (2019). Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de Jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager (doctoral dissertation, université de Mostaganem Abdelhamid ibn Badis), pages 22-34
30. Marion B., Anne-Cecile N., Arnaud F., Renaud P., (2021). Identification des moisissures au laboratoire de routine hospitalière. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2021(529), page 58–65.
31. Barbaros O., Gülsünakdemir E., (eds.). (2014). *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*, pages 1-113.

Références bibliographiques

32. Ouadghiri M., Amar M., Vancanneyt M., Swings J., (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *Fems microbiology letters*, 251(2), page 267-271.
33. Patterson M. J., (1996). Chapter 13 : *Streptococcus*. *Medical microbiology*. 4th edition.
34. Pujol D. C., (2004). Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers (doctoral dissertation, thèse doctorat médecine pharmacie, université Claude Bernard Lyon i.), page 20-25.
35. Tormo H., (2010). Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité (doctoral dissertation, université de Toulouse, université Toulouse iii-Paul Sabatier). Page 35.
36. Teuber M., (1995). The genus *Lactococcus*. In the genera of lactic acid bacteria. Springer, Boston, ma, page 173-234.
37. Thunell, R. K. (1995). Taxonomy of the *leuconostocs*. *Journal of dairy science*, page 11.
38. Badillo V., I. E., Rivera V., L. I., & Calle B., J. (2009). Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Phoma* spp. isolated from onion field soils in Puerto Rico, page 76.
39. Zeller B., (2005). Le fromage de chèvre : spécificités technologiques et économiques (doctoral dissertation), page 35.

Annexes

Annexe 01 : Incubation des échantillons de fromage (coagulation)



Annexe 02 : préparation des milieux de culture

A : Milieu potato-Dextrose Agar (PDA)

- 1- Nous pesons 200 grammes de pommes de terre épluchées.
- 2- Mélanger la pomme de terre hachée avec 1 litre d'eau distillée pendant 30 minutes puis filtrez-le à travers le filtre.
- 3- Nous ajoutons 20 grammes de dextrose et de poudre d'agar-agar avec agitation.
- 4- Stériliser la gélose à l'autoclave durant 20 min à 120°C.

B : Milieu Mueller Hinton

- 1- Nous pesons 19 grammes de poudre et la mélanger dans 500ml d'eau distillée.
- 2- Agiter le mélange en chauffant par la plaque chauffante et verser dans les flacons.
- 3- Stériliser la gélose à l'autoclave durant 20 min à 120°C.

C : milieu Sabouraud

- 1- Mélanger 32,75 grammes de poudre dans 500 ml d'eau distillée.
- 2- Chauffer à ébullition pour dissoudre complètement le milieu et verser dans les flacons.
- 3- Stériliser la gélose à l'autoclave durant 20 min à 120°C.

D : milieu GN

- 1- Mélanger 14 grammes de poudre dans 500 ml d'eau distillée, porté à ébullition en agitant jusqu' à dissolution.
- 2- Verser dans les flacons et stériliser à l'autoclave, durant 20 min à 120°C.

Annexe 03 : la centrifugation



Annexe 04 : Préparation de MacFarland 0.5

- A. Mélanger 0,0307 g de chlorure de baryum (BaCl_2) avec 30,7 ml d'eau distillée.
- B. Mélanger 100 μl acide sulfurique avec 900 μl d'eau distillée.
- C. Nous mettons dans la burette 0,5ml chlorure de baryum et ajoutons la solution d'acide sulfurique préalablement préparée jusqu'à obtenir 10ml, Et le mettre dans un tube.

Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique Option : Microbiologie appliquée

Isolement des champignons à effet antibactérien à partir de Jben

Réaliser par : SARI Radhouane. OUANNES Loubna. LADJAL Manal

المخلص

يعتبر الجبن من المنتجات التقليدية التي لا تزال تحظى بتقدير في المجتمع الجزائري، الأمر الذي يتطلب بالضرورة محاولة تحسين الإنتاج من حيث الكمية وفي المقابل تقليل تكاليف المواد من حيث الوقت ومواد التخثر. حيث أظهر تحليل CaCl₂ تم استخدام منهجية سطح الاستجابة لتحسين الوقت ودرجة الحرارة وتركيز المنفحة، مع وجود ارتباط قوي بين القيم ($P < 0.0001$) والانحدار المتعدد تناسبها مع العائد ANOVA النموذج بواسطة ($R = 0.99$) المتوقعة والفعلية

تأثيرات كبيرة لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة على كفاءة تخثر الحليب

يظل الجبن التقليدي مصدرًا مناسبًا لتطوير الملوثات التي يمكن أن تسبب اضطرابات في الجهاز الهضمي. هذا التنوع في الكائنات الحية الدقيقة لا يستثني الفطريات المجهرية، حيث أظهرت بعض الدراسات أن بعضها ينتج مضادات الجراثيم

تم تحديد SABOURAUD و PDA على وسطي استزراع *Phoma sp* في هذه الدراسة، تم عزل نوع من العفن : الفطر بهذه الصفات المجهرية والميكروسكوبية ثم دراسة قدرته على تثبيط نمو البكتيريا وهي المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية، الزائفة، العصوية، والكلبسيلا الرئوية . كلمات مفتاحية: جبن، حليب الماعز، أمثلية، سطح استجابة، مضاد للجراثيم

Abstract

Cheese is considered one of the traditional products still valued in Algerian society, which necessarily requires an attempt to improve production in terms of quantity and in return a reduction in material costs in terms of time and coagulating materials. Response surface methodology was used to improve time, temperature, rennet concentration, CaCl₂, where model analysis by ANOVA and multiple regression showed its proportionality with yield ($P < 0.0001$) with a strong correlation between expected and actual values ($R^2 = 0.99$) Significant effects of temperature and pH on coagulation efficiency.

Traditional cheese remains a favorable source for the development of contaminants that can cause digestive and various disorders. This diversity of microorganisms is not exempt from microscopic fungi, some studies of which have shown that some of them produce antibacterials.

In this study, a species of mold *Phoma sp* was isolated on two culture media PDA and SABOURAUD. The fungus was determined by these macroscopic and microscopic characteristics, then the study of its ability to inhibit the growth of bacteria, namely:

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: Djben, goat's milk, optimization, response surface, antibacterial.

Résumé

Le fromage est considéré comme l'un des produits traditionnels encore prisés dans la société algérienne, ce qui demande nécessairement une tentative d'amélioration de la production en termes de quantité et en contrepartie une réduction des coûts matériels en termes de temps et de matériaux coagulants. La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour améliorer le temps, la température, la concentration de présure, le CaCl₂, où l'analyse des modèles par ANOVA et régression multiple a montré sa proportionnalité avec le rendement ($P < 0,0001$) avec une forte corrélation entre l'attendu et les valeurs réelles ($R^2 = 0,99$) Effets significatif de la température et du pH sur le rendement de coagulation.

Le fromage traditionnel reste une source favorable pour le développement des contaminants pouvant provoquer des troubles digestifs. Cette diversité de micro-organismes n'est pas exempte des champignons microscopiques, dont certaines études ont montré que certains d'entre eux produisent des antibactériens.

Dans cette étude, une espèce de moisissure *Phoma sp* a été isolé sur deux milieux de culture PDA et SABOURAUD. Le champignon a été déterminé par ces caractéristiques macroscopiques et microscopiques, puis l'étude de sa capacité à inhiber la croissance des bactéries, à savoir :

Staphylococcus aureus ; *Escherichia coli* ; *Pseudomonas* ; *Bacille* ; et *Klebsiella pneumonie* .

Mots-clés : Djben, lait de chèvre, optimisation, surface de réponse, antibactérien.