

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2021

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Arbane Nouria & Rahal Sarah

Thème

**Suivi de la qualité microbiologique d'une nouvelle
formulation de fromage frais enrichi avec les graines de
Pin d'Alep**

Soutenu le : 21 / 09 / 2021

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

MAHDJOUB M-Malik

MCB.

Univ. de Bouira

Président

KADRI Nabil

MCA.

Univ. de Bouira

Examinateur

REMINI Hocine

MCB.

Univ. de Bouira

Promoteur

REMINI-SAHRAOUI Yasmine

MCB.

Univ. de Boumerdes

Invité

Année Universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENTS

Nos vifs remerciements s'adressent à Mr REMINI et Mme SAHRAOUI qui nous ont donné la chance de travailler sous leurs directions, dont les encouragements et les conseils ont permis de réaliser ce travail.

On tient à remercier les membres du jury Mr MAHDJOUR d'avoir accepté de présider notre travail et Mr KADRI pour avoir bien accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements vont également au responsable du laboratoire de recherche BBBS Professeur MADANI, ainsi les membres du laboratoire, une grande reconnaissance pour nous avoir fait profiter de leurs connaissances en matière d'analyses microbiologiques.

Nos remerciements à Mme AADEL KHADIDJA, pour son aide, son soutien et ses conseils très fructueux.

En guise de reconnaissance, on veut remercier toutes les personnes qui, par leurs conseils, leur collaboration ou leur soutien moral et leur amitié, ont contribué à la réalisation et à L'achèvement de ce travail.

DÉDICACES

Je dédie ce mémoire de fin d'études

A

Ma très chère mère et mon très cher père

*En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils
ont fait pour mon éducation ainsi ma formation*

A

Mes chères sœurs, et mes chers frères

Pour leur affection et leur soutien moral

A

Mes neveux et ma nièce

Pour qui je souhaite beaucoup de réussite dans leur vie

A

Tous ce qui ont une relation de proche ou de loin avec la réalisation du présent rapport

ARBANE Nouria

DÉDICACES

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie qu'on dédie ce modeste travail :

A mes chers parents

*Aucune dédicace et aucun mot ne pourraient exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour
que je vous porte.*

Vous êtes la lumière de mes jours, la source de mes efforts et la flamme de mon cœur.

Que Dieu vous garde pour moi.

*A mon cher frère et, sœurs en témoignant de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je
vous porte.*

A ma grande famille : RAHAL

Je vous souhaite une vie pleine de succès, de joies et de bonheur.

Merci pour tous les meilleurs moments que nous avons passés ensemble.

A tous mes amis (es) : merci pour votre amour et encouragement avec tous nos

Vœux de bonheur, santé et réussite.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible

Je vous dis merci.

RAHAL Sarah

TABLE DES MATIÈRES

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....01

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITES SUR LE PIN D'ALEP

I.1. Systématique.....	03
I.2. Caractéristiques botaniques du pin d'Alep.....	03
I.3. La répartition de pin d'Alep.....	04
I.3.1. Dans le monde.....	04
I.3.2. En Algérie.....	05
I. 4. La composition chimique des grains de pin d'Alep.....	06
I.5. Les propriétés pharmacologiques et biologiques de pin d'Alep.....	06
I. 5.1. Usage traditionnel.....	06
I. 5.2. Intérêt thérapeutique.....	06
I. 5.3. Intérêts biologiques.....	07
I. 5.3.1. Activité antimicrobienne.....	07
I. 5.3.2. Activité antifongique.....	07
I. 5.3.3. Activité anti-inflammatoire.....	08

CHAPITRE II : LAIT ET FABRICATION DE FROMAGE

II.1. Le lait.....	09
II.1.2. Composition physico-chimique de lait cru.....	09
II.1.3. La qualité microbiologique de lait.....	10
II.1.4. Les facteurs influençant sur la conservation de lait.....	10
II.2. Fromage.....	11
II.2.1. Définition.....	11
II.2.2. Transformation de lait en fromage.....	11

II.2.2.1. La coagulation de lait.....	11
II.2.2.2. L'égouttage de lait.....	12
II.2.2.3. Salage.....	12
II.2.2.4. Conservation.....	12
II.2.3. Classification des fromages.....	13
II.2.4. Microbiologie du fromage.....	14

PARIE II : PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

III.1. Matériels et équipements.....	16
III.2. Matériel végétale et sa préparation.....	17
III.3. Fabrication de fromage frais enrichis avec les graines de pin d'Alep « <i>P. halepensis</i> Mill ».....	17
III.3.1. Analyses physico-chimique et microbiologique du lait cru.....	17
III.3.1.1. Analyses microbiologiques de lait cru.....	18
III.3.1.1.1. Recherches et dénombrement de la flore d'altération.....	18
III.3.1.2. Analyses physico-chimiques de lait cru.....	19
III.3.1.2.1. L'acidité.....	19
III.3.1.2.2. Test à ébullition.....	20
III.3.1.2.3. Lacto-fermentation.....	21
III.3.1.2.4. Matière sèche.....	22
III.4. Fabrication de fromage frais.....	23
III.4.1. La maturation.....	24
III.4.2. Emprésurage et caillage.....	24
III.4.3. Egouttage et moulage.....	24
III.4.4. Enrichissement.....	25
III.4.5. Salage.....	26
III.4.6. La conservation	26
III.5. Suivi de la qualité microbiologique de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep.....	26

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Fabrication de fromage frais enrichi avec les graines de pin d'Alep.....	28
IV.1.1. Matériel animal.....	28
IV.1.1.1. Résultats des analyses du lait cru.....	28
A. Analyses physico-chimiques.....	28
B. Analyses microbiologiques.....	30
IV.1.1.2. Interprétation des résultats.....	31
IV.1.1.3. Résultats des analyses microbiologiques du lait pasteurisé.....	32
IV.2. Résultats de suivi et l'évaluation de la qualité microbiologique de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep.....	32
IV.3. Discussion sur le processus de fabrication de fromage frais.....	34
IV.4. Examen organoleptique.....	35
Conclusion et perspectives.....	36

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AT : Acidité titrable

ATP : Adénosine-triphosphate

C° : degrés Celsius

c : nombre maximale d'unité

Ca : Calcium

cm : centimètre

D° : degrés dornic

FMAT : Flore mésophile aérobie totale

g : Le gramme

h : heure

ha : l'hectare

JORA : Journal officiel de la république Algérienne

Mg: Magnesium

m : limite microbiologique minimale

M : limite microbiologique maximale

ml: Milliliters

mm : Millimètres

mn : Minutes

N: La normalité

n : Nombre d'unité

NaOH: Hydroxyde de sodium

pH : Potentiel hydrogène

p. halepensis : *pinus halepensis*

SS : Milieu salmonelle-shegella

T : Température

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violet

VRBG : Milieu violet red bile glucose

LISTE DES TABLEAUX :

N° de tableau	Le titre de tableau	La page
Tableau N°1	Répartition du pin d'Alep dans quelques pays du monde.	04
Tableau N°2	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du <i>P.halepensis</i> (Seladji, 2014).	07
Tableau N°3	Activité antifongique de l'huile essentielle du <i>P.halepensis</i> .	08
Tableau N°4	La composition physico-chimique de lait cru	09
Tableau N°5	Caractéristiques des classes de fromage (Vignola, 2002)	14
Tableau N°6	Critères microbiologiques des fromages en fonction des germes (France, 1994)	15
Tableau N°7	Appareillages et produits chimiques utilisés durant la partie expérimentale	16
Tableau N°8	Qualification des laits en fonction de réduction de bleu de méthylène (Guiraud, 1996).	29
Tableau N°9	Résultats des analyses microbiologiques de lait cru	30
Tableau N°10	Résultats des analyses microbiologiques de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep.	33
Tableau N°11	La qualité organoleptique du fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep.	35

LISTES DES FIGURES

N° de figure	Le titre de la figure	La page
Figure N° 01	Aire de répartition du pin d'Alep dans le monde (QUEZEL;1986)	05
Figure N° 02	Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (Seigue, 1985)	05
Figure N° 03	Diagramme de fabrication de fromage frais	13
Figure N° 04	photo représentative de test d'acidité titrable de lait cru	20
Figure N° 05	photo représentative de teste d'ébullition de lait cru	21
Figure N° 06	photo représentative de test de lacto-fermentation de lait cru	22
Figure N° 07	photo représentative de test de la matière sèche de lait cru	23
Figure N° 08	photo représentative de préparation et pasteurisation de lait cru	23
Figure N° 09	photo représentative d'emprésurage et caillage de lait pasteurisé	24
Figure N° 10	photo représentative d'égouttage et de moulage de fromage frais	25
Figure N° 11	photo représentative d'enrichissement de fromage frais	25
Figure N° 12	photo représentative d'un fromage prêt à conserver	26

Introduction

INTRODUCTION

Depuis son apparition, l'homme pour demeurer sur cette terre à tirer parti de la nature pour trouver de quoi se nourrir et se soigner. Il était donc intéressant de réunir toutes les connaissances que l'homme a rassemblées depuis des siècles pour traiter les pathologies.

Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par l'insuffisance ou bien le manque d'accès aux médicaments pharmaceutiques (**Benaissa, 2011**).

L'Algérie bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces plantes constituent des remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif, et surtout dans la fabrication pharmaceutiques et parapharmaceutiques.

En Kabylie particulièrement, les plantes médicinales n'ont jamais été totalement abandonnées, et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne.

Le Pin d'Alep est l'un de ces plantes médicinales le plus répandus en Algérie. Au cours de ces dernières années, les chercheurs ont mis attention sur l'utilisation des différentes parties de cette plante non seulement dans le domaine médical, mais aussi dans l'industrie agroalimentaire.

Parlant sur l'industrie agroalimentaire, la fabrication de fromage est un moyen très pratique et efficace pour la conservation de lait et ces composants qui sont des éléments importants dans l'alimentation humaine, et une source d'énergie par sa richesse en lactose, lipides et en protéines.

L'ensemble de ce travail a pour but d'appuyer sur l'effet antimicrobien d'une plante à caractère médicinal le Pin d'Alep « *Pinus. halepensis Mill* » sur le domaine agroalimentaire

en réalisant un essai de fabrication de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep, et suivre sa qualité microbiologique tout au long de processus de fabrication.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I
Généralité sur le Pin
d'Alep

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PIN D'ALEP**I.1. Systématique**

Selon (NAHAL, 1962 ; in ATHMANI et MASMOUDI, 2008) Le Pin d'Alep "*Pinus halepensis* Mill" est l'essence caractéristique de l'étage bioclimatique méditerranéen semi- aride, il appartient à :

- * **Embranchement** : Phanérogames.
- * **Sous embranchement** : Gymnospermes.
- * **Classe** : Conifères.
- * **Ordre** : Coniféroles pinoidines.
- * **Sous ordre** : Abiétales.
- * **Famille** : Pinacées.
- * **Genre** : *Pinus*.
- * **Sous genre** : *Eupinus*.
- * **Espèce** : *Pinus halepensis*.
- * **Nom scientifique** : *Pinus halepensis* Mill.
- * **Nom commun** : pin d'Alep
- * **Nom arabe** : Sanaoubar al-halabi.

I.2. Caractéristiques botaniques du pin d'Alep

Arbre d'environ 30 mètres, souvent penché et peu droit, la cime est assez écrasée, irrégulière et claire, les branches sont assez étalées (BEKER et al.,1982 ; in BOUTCHICHE et BOUTRIGUE, 2016). Le Pin d'Alep a une longévité importante de 200 à 250 ans, (Fekih et al ,2014). Sa reproduction commence en général vers l'âge de 8-12 ans (Chokri, 2005).

Les différentes parties de pin d'Alep sont présentés comme suite :

- **Les Rameaux** : Sont assez fins avec une couleur vert clair, puis ils changent de couleur en gris clair quand ils deviennent plus âgés. Ils portent une forme polycyclique. (KADIK, 1987 ; in BOUTCHICHE et BOUTRIGUE, 2016).

- **Les bourgeons** : sont non résineux avec une forme ovoïde, aigus, couleur brune avec des écailles libres frangées de blanc (KADIK, 1987 ; in BOUTCHICHE et BOUTRIGUE, 2016).
- **Les feuilles ou les aiguilles** : les feuilles sont très fines, lisse et aigus, d'une taille de 6 à 10 cm de long et une largeur de 1 mm, sont groupées par 2 en pinceaux à l'extrémité des rameaux (NAHAL, 1962 ; in BOUTCHICHE et BOUTRIGUE, 2016).
- **Les cônes** : Ils sont de couleur pourpres puis brun, avec une taille de 6 à 12 cm et un pédoncule épais de 1 à 2cm, lustré avec des écussons aplatis, persistant Plusieurs années sur l'arbre (KADIK, 1987 ; in BOUTCHICHE et BOUTRIGUE, 2016).
- **Les graines** : L'arbre de pin d'Alep produit également une graine comestible, appelée « Zgougou », (BOUTCHICH et BOUTRIGUE, 2016).

Les graines sont de petite taille de 5 à 7 mm, de couleur brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre face (KADIK, 1987 ; in BOUTCHICHE et BOUTRIGUE, 2016).

I.3. La répartition de pin d'Alep :

I.3.1. Dans le monde :

Le bassin méditerranéen occupe l'équivalent de 3,5 millions d'hectares de pin d'Alep, et cette répartition est limitée (QUEZEL, 1986). On trouve que cette espèce est abondante surtout dans le Maghreb et l'Espagne, dont elle trouve son optimum de croissance et de développement (PARDE, 1957 ; in QUEZEL et al, 1992).

Tableau 1 : Répartition du pin d'Alep dans quelques pays du monde.

Pays	Superficie (ha)	Source
Algérie	800 000	(MEZALI, 2003)
Maroc	65 000	(BAKHIYI ,2000 ; in BENTOUATI, 2006)
Tunisie	170 000 à 370 000	(CHAKROUN ,1986)
France	202 000	(COUHERT et DUPLAT ,1993)
Espagne	1 046 978	(MONTERO,2000 ; in BENTOUATI, 2006)
Italie	20 000	(SEIGUE ,1985)

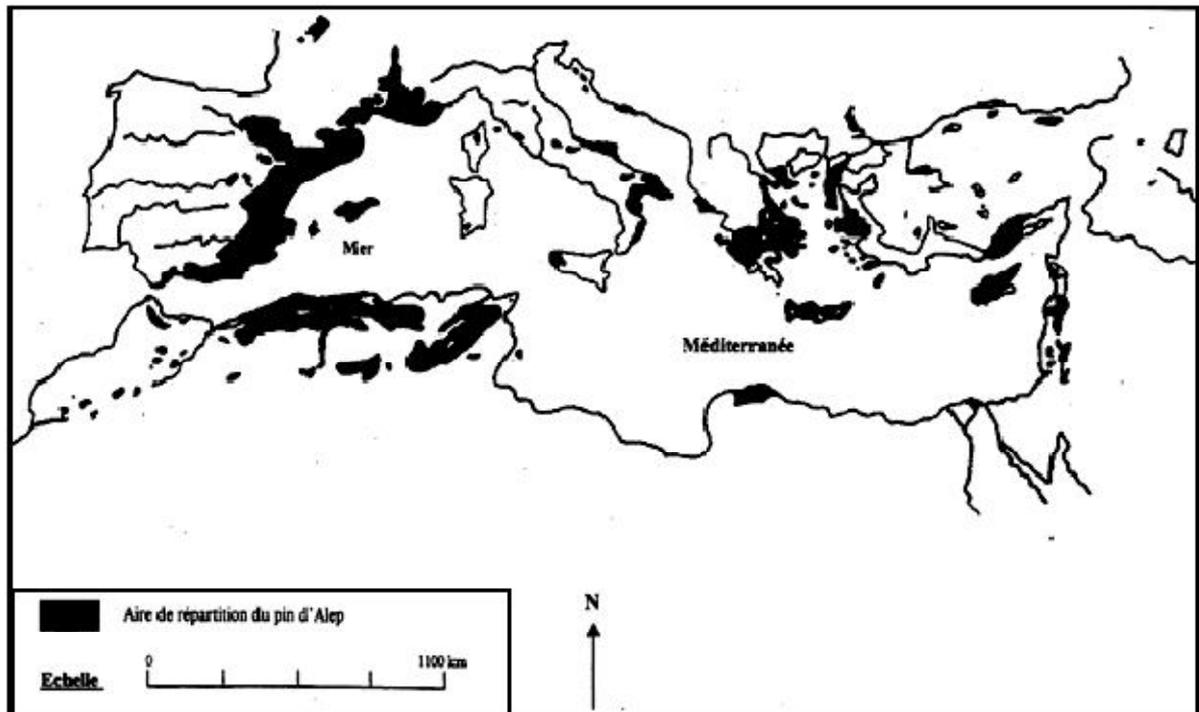


Figure N° 01 : Aire de répartition du pin d'Alep dans le monde (QUEZEL ;1986)

I.3.2. En Algérie :

D'après ZENZEN (2016), le pin d'Alep occupe 37% de la surface boisée de l'Algérie, très fréquent sur les massifs du tell littoral et l'Atlas saharien, Il s'étend sur près de 850.000 ha

Le pin d'Alep présente de vastes peuplements en oranais (Sidi-Bel-Abbès, Saïda, Tlemcen, Tiaret) dans l'Algérois (média, Boghar, Monts des Bibans) sur l'Atlas saharien (mont de Ouled Nail) et dans le sud Constantinois (Aurès, région de Tébessa). (BOUDY ;1955)

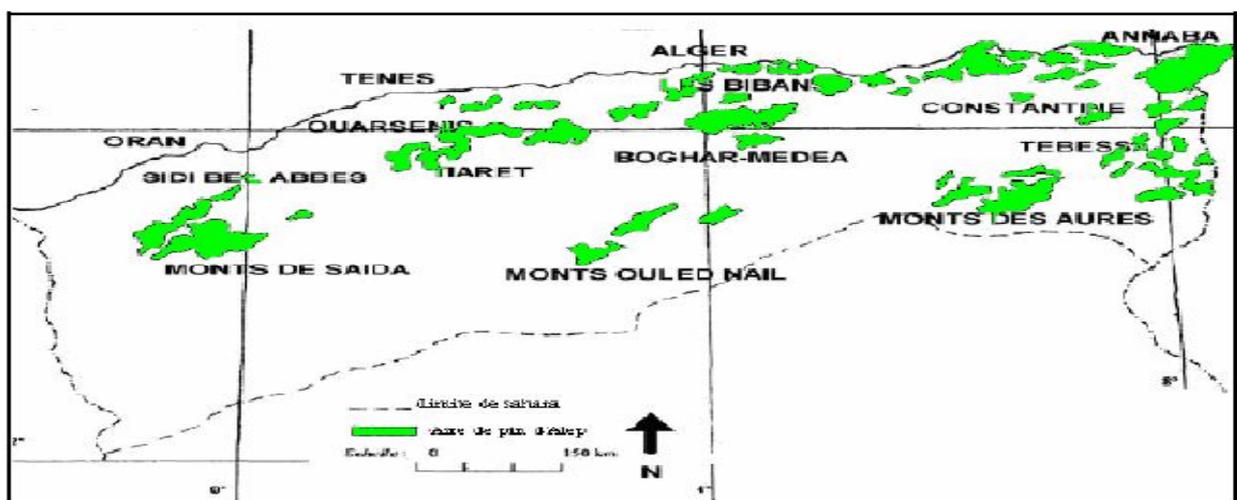


Figure N° 02 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (Seigue, 1985).

I.4. La composition chimique des grains de pin d'Alep :

Les espèces du genre *Pinus* sont largement connues pour leurs propriétés médicinales associées à leur composition chimique. Pour cela, plusieurs études ont été réalisées pour révéler cette composition. On cite :

Les vitamines :

L'huile de pin d'Alep est riche en vitamines ; Comme les vitamines : E ; F, connues pour leur haut niveau physiologique et propriétés antioxydantes, B1 ; B2 ; B3 ; vitamine pro A (bêta-carotène) et d'autres caroténoïdes (**Wang et al, 2006**).

Les éléments minéraux :

L'huile de pin d'Alep contient le magnésium ; zinc ; fer ; cuivre ; iode ; calcium ; phosphore ; manganèse ; cobalt. Ces éléments, ont un effet avantageux pour la santé, ils sont présents avec un taux élevé dans les graines du *Pinus halepensis* (**Wang et al, 2006**).

Les lipides :

Une étude sur la composition lipidique menée par **Cheikh et ses collaborateurs (2006)**, les grains de *Pinus halepensis* Mill, présente une richesse en acides insaturés (acide oléique : 27% et acide linoléique : 48,8%) et d'autres acides saturés comme l'acide palmitique (8,75 %), myristique, myristoléique, palmitoléique, margarique, margaroléique, stéarique, linoléique, arachidique, eicosénoïque, ces derniers se présentent en faible teneur.

Les acides aminés :

L'huile de pin contient jusqu'à 5% de substances azotées, dont 90% sont les acides aminés, parmi lesquels 70% sont des amino-acides essentiels (**Wang et al, 2006**).

Les principaux acides aminés sont : l'acide glutamique (5,5% de poids sec) et l'arginine (4,0%) comprenant environ un tiers (environ 33%) des protéines de graines (**Tukan et al, 2013**).

I.5. Les propriétés pharmacologiques et biologiques de pin d'Alep**I.5.1. Usage traditionnel :**

Le pin d'Alep est très utilisé en médecine traditionnelle algérienne comme :

-Antiseptique puissant recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires et les calculs biliaires.

-Rubéfiant et balsamique, très efficace dans le cas des affections pulmonaires comme la grippe, la sinusite et les rhumatismes (**Seladji, 2014**).

I.5.2. Intérêt thérapeutique :

Jusqu'à présent, les chercheurs visent toujours à évaluer le potentiel biopharmaceutique de différentes espèces de pin d'Alep. Leurs travaux se penchent particulièrement sur le potentiel antioxydant, antibactérien et antifongique. Comme il existe aussi quelques études sur le potentiel anticancéreux des extraits de pins et de composés provenant du genre *Pinus* (Kadari, 2012).

I.5.3. Intérêts biologiques

I.5.3.1. Activité antimicrobienne :

L'huile extrait de graines de pin d'Alep montre une action antimicrobienne, après avoir évaluée cette huile par les chercheurs, leurs études montre que lors d'utilisation de la méthode de diffusion et de micro-titration de l'agar contre six de références, les résultats ont révélé que l'huile essentielle de *P. halepensis* possède des effets inhibiteurs remarquable sur tous les microorganismes testés, mais les souches les plus sensibles sont : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, l'effet antibactérien est probablement attribué à la richesse de cette huile essentielle en β -caryophyllène (Dahham et al, 2015).

Tableau 2 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *P.halepensis* (Seladji, 2014).

Micro-organismes	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	10.0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9.5
<i>Citrobacter freundii</i>	8.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.0

I.5.3.2. Activité antifongique :

L'huile essentielle de *P. halepensis* extraite à partir des aiguilles, montre une activité antifongique contre les champignons mentionnées dans le tableau suivant (Seladji, 2014).

Tableau 3 : Activité antifongique de l'huile essentielle du *P.halepensis*. (Seladji, 2014).

Champignons	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus Niger</i>	3.75
<i>Fusarium oxysporum</i>	9
<i>Rhizopuss tolonifer</i>	3.5

I.5.3.3. Activité anti-inflammatoire :

L'extrait aqueux de l'écorce de *Pinus halepensis*, riche en agents anti-oxydants (polyphénols) y compris les procyanidines et les acides phénoliques (Zoumpliou et al ,2014). Ces derniers diminuent ou inhibent les inflammations de la peau causées par les rayonnements UV / et les rayons X (Petri et al, 2012 ; Orazio et al, 2013 ; Dimaki et al ,2019).

Chapitre II

Lait et fabrication de fromage

CHAPITRE II : LAIT ET FABRICATION DE FROMAGE

II.1. Le lait

Le lait est un fluide biologique complexe sécrété par les mammifères, considéré comme aliment quotidienne de l'homme vu sa composition en nutriments de base (protéines, lipides et glucides) et sa richesse en calcium et son apport non négligeable en vitamines (A, B2, B5 et B12) et en divers sels minéraux (OUALI, 2003). Du point de vue physico-chimique, le lait peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse contenant de nombreux éléments, dont les uns sont à l'état dissous (lactose, sels, vitamines, protéines et composés azotés solubles) et les autres sous la forme colloïdale (micelles de caséines, phosphate de Ca et Mg) (LUQUET, 1990).

II.1.2. Composition physico-chimique de lait cru

Le lait de vache est un liquide opaque, de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible, mais identifiable. Le pH est voisin de la neutralité. Les principales constantes physiques du lait sont représentées en tableau ci-dessous

Tableau 4 : La composition physico-chimique de lait cru

Constituants	Moyennes
Matières azotées	34
Lactose	48
Matières salines	9
Extrait sec dégraissé	91
Matières grasses	37
Extrait sec total	128
Eau libre (solvant) et liée	902
Lait entier	1 030

Source : Alais, 1984.

II.1.3. La qualité microbiologique de lait

Les microorganismes présents dans le lait sont principalement des bactéries. Par contre on peut trouver des levures, des moisissures et des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue pour elles un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc.), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie fromagère), plusieurs substances protéiques, tel que les toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (**INSTITUT DE L'ELEVAGE, 2009**).

La nature des bactéries contaminants de lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages (**AGABRIEL ET AL., 1995**), aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (**ROBINSON, 2002**). On peut considérer le lait comme peu contaminé s'il renferme quelques centaines à quelques milliers de germes par millilitre, par contre un lait fortement contaminé peut contenir plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions par ml (**RAMET, 1985**). Dans cette microflore contaminante, les bactéries influencent directement sur la qualité hygiénique, ainsi que l'aptitude de la conservation et la transformation de la matière première (**ADDA ET AL, 1982**).

II.1.4. Les facteurs influençant sur la conservation de lait

La durée de conservation du lait est limitée à environ 3 semaines au maximum, de nombreux facteurs contribuent à cette durée tel que : La qualité microbiologique du lait cru, les enzymes bactériennes, les enzymes du lait (lipoprotéine lipase, plasmine) et la température de stockage (**Walstra et al., 2006**).

La limite de la durée de conservation peut être signalée par des changements d'aspect, d'odeur ou de saveur, ces derniers impliquent dans :

- **Les transformations physico-chimiques**

Se manifeste par : Écrémage de la matière grasse, le gel des protéines de lactalbumine, caillage du lait et de la cristallisation des minéraux.

- **Les transformations chimiques**

Il se manifeste par un brunissement et une oxydation non-enzymatiques de la matière grasse.

- **Les transformations biochimiques**

Se manifeste par la croissance des microorganismes, dégradation enzymatique, fermentation et affinage du fromage.

Cependant, la limite principale de la durée de la conservation est liée à la croissance des bactéries d'altération, des levures et moisissures qui se développent à la température de réfrigération ($< 8\text{ °C}$) (fox, 2000 ; Jentet *et al.*, 2008).

II.2. Fromage

II.2.1. Définition

Selon la norme (Codex STAN 283-1978), le fromage est un produit affiné ou non, de différent consistance parton de molle à l'extra-dure, dans lequel le rapport protéines de Lactosérum /caséines ne dépasse pas celui du lait. On l'obtient par coagulation complète ou partielle du lait grâce à l'action de la présure et d'autres agents coagulants tel que les ferments lactiques, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de la coagulation, ou par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait, et/ou des produits provenant du lait, de façon à obtenir un produit fini, ayant des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques correspondant à la définition précédente (Eck, 1997).

II.2.2. Transformation de lait en fromage

La fabrication de fromage par méthode classique vise à transformer le lait suivant trois étapes successives : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La dernière étape n'existe pas dans le cas des fromages frais (Evette, 1975). La qualité de fromage dépend de la qualité de lait, en termes de conditions normales de travail, le rendement satisfaisant, la composition chimique, la richesse de lait en caséines et sa charge microbienne, la nature de sa microflore, son aptitude à développer des bactéries lactiques, sans nier son comportement vis-à-vis de la présure (Remeuf *et al.*, 1991).

II.2.2.1. La coagulation de lait

Dans la fabrication de fromage, l'étape de coagulation est indispensable, car elle permet d'expulser une grande partie d'eau et de matière soluble(sérum) pour obtenir à la fin un caillé (**Lenoir et al., 1983**).

La coagulation du lait correspond à une modification physico-chimique, dont on aura une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait. Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

-Par voie enzymatique, à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure,

-Par voie fermentaire, à l'aide des bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains). (**Eck et Gillis, 1990**).

II.2.2.2. L'égouttage de lait

L'égouttage est l'étape qui permet d'éliminer une quantité de lactosérum à fin d'avoir un bon caillé, c'est un phénomène dynamique qui fixe les caractéristiques physiques (pH et AW) et chimiques du caillé (**Weber, 1997**).

Selon le type d'égouttage effectué, deux catégories de fromages se distinguent : le fromage égoutté en moule, et le fromage égoutté en vrac sous forme de pâte où l'égouttage passe avant le moulage (**Eck and Gillis, 2006**).

II.2.2.3. Salage

Les fromages sont salés soit par saupoudrage de sel sec, soit par immersion dans l'eau salée (saumure).

II.2.2.4. Conservation

La conservation du fromage se fait par le maintien du froid qui consiste à limiter ou annuler l'évolution des germes, on utilise généralement des températures comprises entre 0°C et +2°C (**Dossou et al., 2006**).

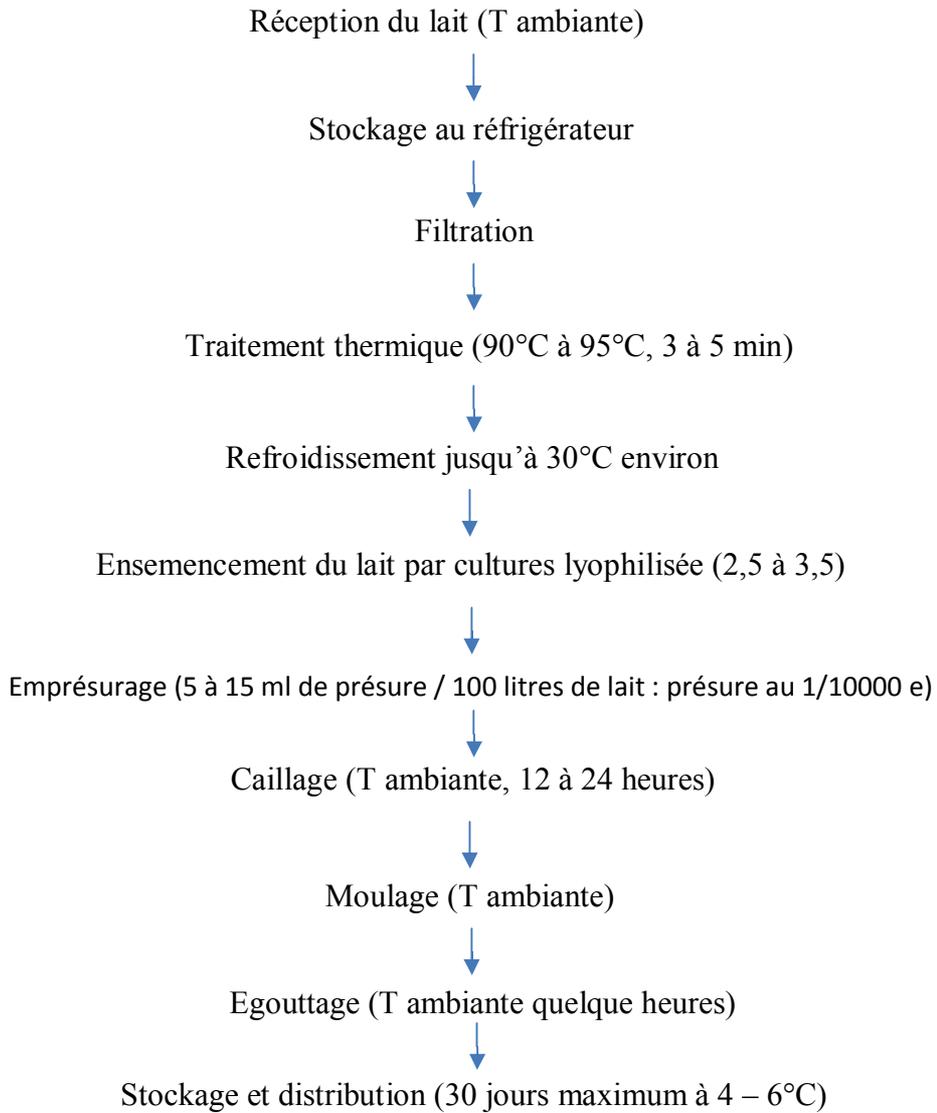


Figure N°3 : Diagramme de fabrication de fromage frais

II.2.3. Classification des fromages

Le tableau ci-dessous donne la classification des fromages en fonction des différents types de coagulations et d'égouttages.

Tableau 5 : Caractéristiques des classes de fromage (Vignola, 2002)

Classification suivant le type de coagulation		
Techniques		Caractéristiques de caillé
Caillé lactique	Faible quantité de présure Température de coagulation de 18-28°C Temps de coagulation entre 4 et 20h PH de de caillage 4,6-5,0	Riche en eau, pauvre en calcium Faible cohésion Durée de conservation limitée
Caillé présure	Forte quantité de présure Température de coagulation de 30 à 40°C Temps de coagulation entre 20 et 60 mn PH de caillage 6,0 à 6,7	Egouttée, riche en calcium Elastique et souple Apte à l'affinage
Classification suivant le type d'égouttage		
Techniques		Caractéristiques du fromage
Egouttage lent	Mise en moule avec ou sans coupage Séparation de sérum par filtration, ultra filtration ou centrifugation	Riche en eau Petit format Conservation limitée à quelques semaines Texture friable ou molle
Pâte pressée (non cuite)	Caillage, brassage du caillé Pré-pressage Mise en moule Pressage	Humidité intermédiaire Format restreint (environ 1 Kg) Affinage de quelques mois Texture souple et moelleuse

II.2.4. Microbiologie du fromage

La réussite de production de fromage dépend de la présence des microorganismes utiles qui lui donnent ses caractéristiques de texture, de saveur, d'aspect, etc. tout en limitant la contamination par des germes indésirables et en entravant leur développement. (Le Jaouen, 1993).

Parmi les micro-organismes indésirables susceptibles de contaminer le lait et les fromages, il faut distinguer deux catégories selon le degré de gravité :

- les pathogènes, dangereux pour la santé humaine qui doivent être absents.
- les germes nuisibles à la qualité organoleptique des fromages.

Les critères microbiologiques du fromage sont donnés dans le tableau ci-dessous

Tableau 6 : Critères microbiologiques des fromages en fonction des germes (France, 1994)

Germes Types de fromages	<i>Listeria Monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Coliformes</i>
Fromages à pâte dure au lait cru	Absence dans 1 gramme n = 5 ; c = 0	Absence dans 1 gramme n = 5 ; c = 0	M=10 000/g m = 1 000/g n = 5; c = 2	M=100 000/g m = 10 000/g n = 5 ; c = 2	-
Fromages à pâte molle au lait cru	Absence dans 25 grammes n = 5 c = 0	Absence dans 1 gramme n = 5 c = 0	M=10 000/g m = 1 000/g n = 5 c = 2	M=100 000/g m = 10 000/g n = 5 c = 2	M=100000 m=10000 n=5 c=2
Fromages Non affinés au lait cru					

Partie Pratique

Chapitre III

Matériels et méthodes

CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans l'intention de mettre en valeur l'effet antimicrobien d'une partie d'un arbre peu tirer profit les graines de Pin d'Alep. dont le nom scientifique *Pinus halepensis Mill.* Le présent travail afflué sur la détermination de leur éventuel antimicrobien, d'une part et étudier la possibilité d'augmenter la valeur alimentaire par un essai d'enrichissement d'un fromage frais avec les graines de pin d'Alep d'autre part.

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire Biomathématique Biophysique Biochimie et Scientométrie BBBS de l'université Abderrahmane Mira Bejaia en collaboration avec l'université Akli Mohand Oulhadj Bouira. Dont l'étude a été menée durant la période s'étalant de mai à juillet 2021.

III.1. Matériels et équipements :

Le tableau ci-dessous représente les matériaux et les équipements utilisés durant l'expérience.

Tableau 7 : Appareillages et produits chimiques utilisés durant la partie expérimentale

Appareillages	Réactifs et milieux de cultures
-Etuve	Réactifs :
-Bain marie	- Phénolphtaléine
-Autoclave	-Bleu de méthylène
-Plaque chauffante agitatrice	-Solution NaOH
-Balance de précision	-Tellurite de potassium
-Thermomètre	-Sélénite cystine
	-L'eau peptone
	-Alcool
	Milieux de cultures :
	-VRBG
	-Gélose nutritive
	-Baird parker
	-Hektoen
	-SS

III.2. Matériel végétale et sa préparation :

Dans notre étude on a utilisé des grains de *P. halepensis Mill* qu'on a achetés chez un herboriste à Bouira. Le matériel végétal utilisé pour cette expérience récolté à un stade optimal de maturation.

La préparation des grains se fait comme suivant :

En premier lieu, les impuretés associées aux grains de *P. halepensis Mill* ont été éliminées par un rinçage avec de l'eau du robinet. Le tout a été déposé sur un tissu absorbant propre, et laissé sécher à l'air libre dans un endroit sec et ventilé à l'abri du soleil pendant 7 jours. Après séchage, les graines ont été torréfiées dans une poêle pendant 5 min, broyées à l'aide d'un broyeur électrique.

III.3. Fabrication de fromage frais enrichi avec les graines de pin d'Alep « *P. halepensis Mill* ».

III.3.1. Analyses physico-chimique et microbiologique du lait cru :

Avant d'aborder la fabrication du fromage, il est important de connaître les qualités physico-chimiques et microbiologiques de lait dans lequel on fabrique le fromage.

1. Préparation des milieux de culture :

En fonction des besoins et des germes à rechercher, les milieux de culture sont préparés suivant le mode opératoire indiqué sur l'étiquette de la boîte de chaque milieu de culture. On pèse la quantité voulue, puis on la mélange avec de l'eau distillée dans les proportions indiquées sur le protocole de préparation de chaque milieu de culture. Ce mélange est chauffé et bien homogénéisé dans une erlenmeyer sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique.

La stérilisation du produit se fait à l'autoclave, et le milieu ainsi préparé est conservé dans des flacons en verre.

2. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales :

Au laboratoire, l'échantillon subit un traitement permettant d'obtenir les dilutions décimales selon le Journal Officiel de la République Algérien.

2.1. Suspension mère (première dilution) :

C'est une émulsion obtenue après avoir peser ou mesurer une quantité de produit à analyser (dans notre cas les échantillons sont : 1 ml de lait ou 1 g de fromage) ce produit a été mélangé avec une quantité neuf fois égale de diluant, en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en existe. **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 70**

2.2. Dilutions décimales :

C'est des suspensions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère avec un volume neuf fois égal de diluant et en répétant cette opération sur les dilutions suivantes, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture. Dans notre expérience on a utilisé l'eau physiologique comme diluant. **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 70**

III.3.1.1. Analyses microbiologiques de lait cru :

III.3.1.1.1. Recherches et dénombrement de la flore d'altération :

1. La flore mésophile aérobie totale (FMAT) :

Bon indicateur de contamination, est dénombré sur gélose nutritive et ensemencé en masse, (dilution 10^{-4} , 10^{-5}) incubée 24h à 48h à 30°C. **JORA N° 70 ET JORA N° 39**

Staphylococcus aureus :

Sont dénombrés sur la gélose Baird-Parker additionnée au jaune d'œuf et au tellurite de potassium, ensemencé en masse, (dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) et incubée 48h à 37°C. **JORA N° 70 ET JORA N° 39**

Les coliformes fécaux :

Correspondent le plus souvent à *E.Coli*. L'ensemencement se fait en double couche sur VRBG en déposent 1 ml des dilutions (10^{-1} à 10^{-3}) à 44°C, les colonies typiques sont rouges avec un diamètre de 5mm. **JORA N° 70 et JORA N° 39**

Salmonella :

Pré-enrichissement en introduisant 2 ml de lait dans 15 ml d'eau peptonée tamponnée puis homogénéisation et incubation à 37°C pendant 16h à 20h.

Enrichissement 1ml de liquide pré-enrichissement dans 10 ml de bouillon sélénite-cystéine puis incubation 24h à 37°C.

L'isolement est réalisé par ensemencement de 1 ml de solution enrichie sur le milieu SS (salmonella-shigella) incubé 37°C pendant 24h à 48h. JORA N° 70

III.3.1.2. Analyses physico-chimiques de lait cru :**III.3.1.2.1. L'acidité :****Principe :**

L'acidité titrable est une mesure de la concentration totale d'acide lactique, se fait par titrage avec NaOH 0.1N en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré qui indique la limite de la neutralisation par le changement de la couleur en rose pâle. Cette acidité est exprimée par le degré Dornic (°D), qui est une unité de mesure d'acidité de lait au nom de Mr. Dornic, ancien directeur de l'école d'industrie laitière, 1°D correspond à 0,1g d'acide lactique par un litre de lait. (AFNOR, 1993)

Mode opératoire :

Un volume de 10 ml de lait cru a été introduit dans un bécher, puis 3 gouttes de phénolphthaléine ont été ajoutées. Le titrage est réalisé à l'aide d'une solution NaOH 0.1N ajoutée goutte à goutte. Une agitation délicate est assurée à chaque goutte versée jusqu'au premier virage où une coloration rose apparaît. Le volume de NaOH nécessaire au virage a été noté (chute de burette) en dixièmes de millilitre. (AFNOR, 1993)

NB : le lait de vache est considéré comme frais si son degré Dornic est inférieur à 18°D.

Expression des résultats :

L'acide lactique = V de la chute de NaOH = V du la chute de NaOH*10 (°D).



Figure 04 : photo représentative de test d'acidité titrable de lait cru

III.3.1.2.2. Test à ébullition :

Permet d'anticiper le comportement du lait par un traitement thermique (Guiraud, 1996), les résultats sont exprimés comme suivant :

- Présence d'une seule phase : lait stable.
- Présence de deux phases : lait instable (caillé).

Le mode opératoire :

Une quantité du lait a été chauffée sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition.



Figure 05 : photo représentative de teste d'ébullition de lait cru

III.3.1.2.3. Lactofermentation :

La plupart des bactéries possèdent la capacité de se multiplier dans le lait. Grâce à l'action de leurs réductases, ce test s'effectue en incubant le lait à 37°C, ce qui favorise le développement de certains germes indésirables. Si le germe est présent, sa multiplication provoquera une modification du caillé obtenu. Cependant, l'obtention d'un caillé bien lisse est une garantie d'aptitude à l'acidification du lait, et de l'absence de germe indésirable en quantité suffisante. **(Guiraud, 1996)**

Le mode opératoire :

Avant le prélèvement, le lait non ensemencé a été bien agité pour homogénéiser le composant de lait. 10 ml du lait ont été introduits dans un tube stérile en associant le même tube à l'épreuve de 1 ml du bleu de méthylène.

Le tube a été incubé à 37°C pendant 24h. **(Guiraud, 1996)**



Figure 06 : photo représentative de test de lactofermentation de lait cru

III.3.1.2.4. Matière sèche :

La teneur en matière sèche est estimée par évaporation de 10 ml de lait introduit dans une capsule à poids vide connu puis dessiccation de l'échantillon (10 ml) 3h à l'étuve à 105°C. (AFNOR, 1993)

Mode opératoire :

Le poids de la capsule a été pesé à vide. Dans la même capsule 10 ml de lait ont été introduit et peser à nouveau.

Expression des résultats :

La matière sèche est exprimée en g/l est égale a :

$$(M_1 - M_0) \text{ g} / V \text{ (l)} \text{ Où :}$$

M_0 : la masse en gramme de la capsule vide.

M_1 : la masse en gramme de la capsule contenant la matière sèche après dessiccation.

V : le volume en millilitres de la prise d'essai (10 ml).



Figure 07 : photo représentative de test de la matière sèche de lait cru

III.4. Fabrication de fromage frais :

A la réception de 2 litres de lait cru entier issu de la traite du matin, au niveau de laboratoire, il subit une filtration en se servant d'une bonde a gaz stérile, puis versé dans un récipient pour la pasteurisation à température 72°C pendant 15 secondes et refroidi immédiatement à 4 °C dans un réfrigérateur.



Figure 08 : photo représentative de préparation et pasteurisation de lait cru

III.4.1. La maturation :

Pendant cette étape 2 pots de yaourt nature ont été ajoutés pour les 2 litres de lait pasteurisé, le mélange subit un chauffage sur une plaque chauffante jusqu'au maintien d'une température de 45°C

III.4.2. Emprésurage et caillage :

Pour avoir un bon caillé d'une texture homogène et lisse, le jus de citron et le vinaigre blanc ont été ajoutés d'une quantité égale qui correspond à 45ml, ces deux derniers remplacent les ferments lactiques et la présure.

Le mélange a été laissé agir pendant 30 minutes, ce qui permet d'avoir un début de coagulation.

Le lait a été réchauffé à nouveau pour atteindre une température de 60°C, dans cette étape la séparation de caillé et le lactosérum était complète.



Figure 09 : photo représentative d'emprésurage et caillage de lait pasteurisé

III.4.3. Egouttage et moulage :

Le caillé a été vidé de son lactosérum, l'opération de l'égouttage a été réalisée à l'aide des bandes à gaz stériles, et moulé dans des moules en plastique perforé spécial.

Les moules ont été laissées dans le réfrigérateur pendant 17h, jusqu'au moment d'évacuation partiel de lactosérum pour obtenir la texture de la pâte.



Figure 10 : photo représentative d'égouttage et de moulage de fromage frais

III.4.4. Enrichissement :

L'enrichissement a été réalisé par l'ajout des grains de pin d'Alep broyés directement dans le fromage frais à raison de 3%, accompagné par la crème fraîche légère à 2% (2 mL pour 100 g).

Le tout a été mélangé soigneusement, et moulu une autre fois dans les pots et réfrigéré de nouveau.



Figure 11 : photo représentative d'enrichissement de fromage frais

III.4.5. Salage :

Le salage a été fait par le saupoudrage de sel alimentaire à la main à 1% (1 g de sel pour 100 g de fromage), cette opération a été faite en deux étapes successives : le premier tournant, dont la face inférieure a été saupoudrée avec du sel et renversée puis réfrigérer pendant 2h, le deuxième retournement, la face supérieure a été saupoudrée avec du sel et renversée et réfrigérer de nouveau pendant 2h.

III.4.6. La conservation :

Le fromage a été découpé en cubes, conditionné et séparé en cinq boîtes stériles nommées J0, J3, J7, J15 et J21. Ces dernières correspondent aux jours des analyses microbiologiques, et conservées au réfrigérateur à 4°C.



Figure 12 : photo représentative d'un fromage prêt à conserver

III.5. Suivi de la qualité microbiologique de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep :

1. Préparation des dilutions :

Pour obtenir les dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) quatre tubes stériles contenant 9 ml de l'eau physiologique ont été préparés, dans le 1^{er} tube 1 g de fromage frais a été établi puis homogénéisé à l'aide d'un vortex pour obtenir à la fin une solution mère.

Avec une micropipette, 1 ml de la solution mère a été prélevé et verser dans le 2ème tube afin de préparer la dilution 10^{-1} , la même opération a été faite pour le reste des dilutions. **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 70**

Après avoir préparé toutes les dilutions, 1 ml de chaque dilution a été ensemencé dans un milieu de culture qui correspond au germe recherché comme suivant :

Selon le **JORA N° 70** et **JORA N° 39** :

E. coli :

Pour la recherche des *E.coli* , les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont été utiliser en prélevant 1ml de chaque dilution et ensemencer sur le milieu VRBG en double couches.

Les boites ont été incubées à 44°C pendant 48h.

Staphylococcus aureus :

Pour la recherche des *Staphylococcus aureus* les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont été choisies, 1 ml de diluant a été prélevé et ensemencé sur le milieu Baird-Parker en utilisant la technique de râteau.

Les boites ont été incubées à 37°C pendant 48h.

Salmonella :

Pour la recherche des salmonelles on a passé par trois étapes :

Pré-enrichissement en introduisant 2 ml de lait dans 15 ml de l'eau peptonée tamponné puis homogénéisation et incubation à 37°C pendant 16h à 20h.

L'enrichissement : 1 ml de la solution mère a été prélevé et établi dans des tubes contenant 10 ml de sélénite-cystine, homogénéisé manuellement puis incubé pendant 24h.

L'isolement : 1 ml de la solution enrichie a été ensemencé par la technique de râteau sur le milieu SS et le milieu Hiktoen, puis incubé à 37°C pendant 48h.

Chapitre IV

Résultats et discussion

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Fabrication de fromage frais enrichi avec les graines de pin d'Alep

IV.1.1. Matériel animal

Le lait cru collectés provient de plusieurs vaches dans différents points d'élevages de bovins laitiers à Bejaia. Ces points ont été choisis suivant la disponibilité des éleveurs et la quantité de lait nécessaire pour des raisons de faible productivité laitière des vaches dans la zone d'étude. Le lait est transporté au laboratoire BBBS dans une glacière en une durée qui ne dépasse pas une heure qui doit être immédiatement réfrigérée.

IV.1.1.1. Résultats des analyses du lait cru

Tel que définie par la norme générale Codex Alimentarius, le lait cru est un lait riche sur le plan nutritionnel, qui n'a subi aucun traitement détruisant, donc il doit être sévèrement contrôlé avant sa production et sa consommation (Ameur,2007).

A. Analyses physico-chimiques :

L'acidité :

D'après Cécile. L (2011), la mesure de l'acidité Dornic est utile pour vérifier la bonne activité des ferments lactiques, comme il permet de vérifier que la fermentation n'a pas commencé et que la charge microbienne n'est pas élevée, ainsi de surveiller l'augmentation de l'acidité dans le procédé de fabrication de caillé.

Selon les résultats obtenus :

Volume de la chute de NaOH = 3,3ml

L'acidité titrable : AT = 33 D°

Ces résultats montrent l'augmentation de l'acidité de lait involontairement, donc il n'est pas conforme à la réglementation en vigueur, cela signifie de mauvaise hygiène et un développement intense de micro-organismes (mauvais refroidissement, durée trop longue de transport...) (Cécile L, 2011).

Comme ils expliquent (Cayot et Lorient, 1998) dans leurs travaux, que l'acidité du lait pourrait être due à la dégradation protéique. (Lankveld, 1995) signale que, quand le lait deviendra acide, les protéines du lait ont subi une dénaturation.

La teneur en acide lactique du lait dépend de sa fraîcheur et augmente avec le temps, il a été trouvé convenable de retenir la mesure de l'acidité comme indice de la possibilité même d'emploi du lait dans l'alimentation.

L'explication de ce choix évident si l'on considère que la formation d'acide lactique aux dépens du lactose signale la présence de conditions favorables au développement microbien. (A. Foschini et al., 1949)

Test à ébullition :

Le chauffage du lait jusqu'à ébullition, un test rapide simple et moins coûteux, si le lait coagule il n'est pas frais, mais il ne peut pas indiquer si le lait est frais ou légèrement acide (Hamama A, 2002).

Notre lait présente une phase, et il s'écoule le long des parois de récipient sans laisser des traces de grumeaux, donc son comportement est stable.

Lacto-fermentation :

Ce test permet de détecter que la présence de germes qui peuvent modifier la structure de caillés, et ne permet pas de mettre en évidence la présence de *salmonella*, un lait normal qui ne coagule pas avant 12 heures.

Tableau 8 : qualification des laits en fonction de réduction de bleu de méthylène (Guiraud, 1996).

Qualité de l'échantillon	Temps de réduction de bleu de méthylène
Lait contaminé	$T < 2$ heures
Lait peu contaminé	$2 \text{ heures} < T < 4 \text{ heures}$
Lait de bonne qualité	$4 \text{ heures} > T$

Le coagulum obtenu n'est pas homogène, floconneux et le bleu de méthylène ajouté est décoloré au bout de 3h, cela confirme la présence des germes indésirables dans le lait, vu qu'il est un produit sensible à toute contamination microbienne. (Guiraud, 1996).

La matière sèche :

Selon les résultats obtenus :

$M_0 = 88,44g$	$M_1 = 89,67g$	$V = 10ml$
----------------	----------------	------------

$$\frac{(M_1 - M_0)}{V} = \frac{1,23}{0,01} = 123 \text{ g/l}$$

La teneur en matière sèche obtenue est **123 g/l**, cette valeur est proche à celle trouvée par Taybi *et al.* (122,92 g/l) en 2014 et supérieur à celle trouvée par Labioui *et al.* (117,5 g/l) en 2009.

D'après Bengoumi *et al.*, (1994), la matière sèche diminue davantage sous l'effet du stress hydrique et sa teneur dans le lait varie également en fonction du stade de lactation.

B. Analyses microbiologiques :

Tableau 09 : Résultats des analyses microbiologiques de lait cru.

Les germes	Les valeurs (UFC/ ml)	Limites microbiologiques (UFC/ ml)	
		M	m
FMAT	$8,5.10^6$	3.10^5	3.10^6
Coliformes fécaux	$2,8.10^5$	5.10^2	5.10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10^2	10^3
<i>Salmonella</i>	+	Absence dans 25 ml	
(-) : absence		(+) : présence	
M : limite maximale		m : limite minimale	

IV.1.1.2. Interprétation des résultats

La valeur moyenne de la FMAT ($8,5.10^6$ ufc / ml) est inférieure à celles trouvées au Bénin par **Kora (2005)** ($6,5.10^7$ et $2,9.10^7$ ufc / ml) ainsi **Taybi et al (2005)** ($2,15. 10^7$ ufc / ml) et supérieure à celle trouvée par **Oubari (2004)** ($7,42.10^6$ ufc / ml)

La présence de la FMAT est probablement le résultat d'une multiplication bactérienne intense favorisée par la non-maitrise des conditions d'hygiène lors de la traite et de stockage du lait. **Mhone et al, (2011)**.

La teneur en coliformes fécaux ($2,8.10^5$ ufc / m) est supérieure à ($5,2.10^3$ ufc / ml) trouvé par **Labioui et al,.(2009)** et ($1,8.10^5$ ufc / ml) trouvé par **Hamama et El Mouktafi (1990)**.

La présence des coliformes fécaux est le signe le plus souvent d'une contamination exogène d'origine fécale. **(Ashnafi, 1996)**

Aucune contamination par *Staphylococcus aureus* n'est observée, contrairement aux études réalisées par **Flook et al (2004)** dont ils avaient trouvé (12.10^3 ufc / ml).

Cette absence peut être justifiée par l'absence des infections des mamelles et la bonne santé des vaches. Toutes les bactéries de genre staphylocoque constituent un risque réel pour la santé publique dans les produits transformés car ils peuvent produire dans certaines conditions des entérotoxines thermostables résistant au traitement thermique **(Ashnafi, 1996)**.

La présence de *Salmonella* peut être due à l'infection des vaches par cette bactérie (salmonellose), sont hébergées dans l'intestin, se manifestant le plus souvent sous forme de gastro-entérite, en effet le lait cru issu de ces vaches malades sera contaminé par *Salmonella*.

La qualité microbiologique du lait cru de vache a permis de prouver des charges en différents groupes et espèces microbiens en comparant aux normes recommandées par JORA n° 39. Nous constatons que le lait cru n'est pas satisfaisant sur le plan microbiologique.

Les germes recherchés indicateurs de la contamination permettent de juger l'état hygiénique d'un produit comme le lait qui est imposé à des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte et de la température de conservation.

La qualité microbiologique du lait est importante pour sa conservation ainsi que sa transformation (**Guinot et al., 1995**). Cela nous conduits à procéder à la pasteurisation.

Selon **Alais et Coll, (2003)** la pasteurisation du lait qui est un chauffage de 72 à 75°C pendant 15 à 20 secondes, permet de détruire les germes pathogènes et réduire la flore totale, et d'augmenter ainsi sa durée de conservation.

IV.1.1.3. Résultats des analyses microbiologiques du lait pasteurisé :

Les résultats montrent aucune croissance microbienne vis-à-vis des germes pathogènes recherchés *E.Coli*, *S.aureus* et *salmonella*, vu qu'ils sont des bactéries sensibles à la chaleur et non sporulées, ce qui facilite leur destruction.

IV.2. Résultats de suivi et l'évaluation de la qualité microbiologique de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep :

Ce travail avait pour but de démontrer si les graines de pin d'Alep *pinus halepensis* ont un pouvoir antibactérien pour conserver le fromage une longue durée.

Le volume de fromage testé est 293,07g contient 8,79g de la poudre des grains de pin d'Alep.

Tableau 10 : Résultats des analyses microbiologiques de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep.

Temps Germes	JOUR 0	JOUR 03	JOUR 07	JOUR 15	JOUR 21	Limites microbiologique (UFC / g)	
						m	M
<i>Esherichia coli</i>	-	-	-	-	-	10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	10	10 ²
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	Absence dans 25 g	
(-) : Absence m : limites minimale M : limite maximale							
JOUR 0 : présent le jour dont le produit final est prêt							

L'activité antibactérienne montre une absence totale de bactéries pendant 21 jours. D'après les résultats obtenus, nous pouvons considérer les graines de *Pinus halepensis* Mill comme conservateur naturel d'après son effet inhibiteur vis-à-vis les germes testés.

L'étude de **Dahham et al (2015)**, *P.halepensis* Mill possède des effets inhibiteurs remarquables sur plusieurs micro-organismes, parmi les souches les plus sensibles *Staphylococcus aureus*, l'effet antibactérien est probablement dû à la richesse de ces grains en β -caryophyllène.

L'huile essentielle de *P. halepensis* entraîné une augmentation de la perméabilité cellulaire et une fuite conséquente des constituants cellulaires, grâce à son caractère hydrophobe, les cibles de ces huiles essentielles sont : la paroi cellulaire et la perturbation membranaire, modification de la production d'ATP et de la synthèse des protéines, la perturbation de pH, les changements intracytoplasmiques, les dommages d'ADN...etc. (**Cox et al, 2000**).

D'après **Fekih et ses collaborateurs (2014)**, l'effet inhibiteur de l'huile de *p.halepensis* sur certains micro-organismes testés (*L.monocytogenes*, *K.pneumonia*, *E.faecalis*, *Acinitobacter baumannii*) est lié aux composants monoterpènes oxygénés qui constituent (16,2 %) de l'huile.

De plus, l'étude de **Kaplan et son équipe (2007)**, a révélé que les bactéries Gram- sont plus résistantes à l'huile essentielle de *P.halepensis* que les bactéries Gram+, cette résistance a probablement contribué à la présence d'une membrane externe entourant la paroi cellulaire.

IV.3. Discussion sur le processus de fabrication de fromage frais :

La pasteurisation du la matière première, conduit à la destruction de la microflore originelle du lait, qui sont responsables de la fermentation lactique, produisent l'acide lactique en dégradant le lactose du lait, en effet cet acide lactique va acidifier le lait et former un caillé lactique (voie fermentaire).

Le yaourt nature utilisé au cours du processus de fabrication de notre fromage artisanal sert à remplacer les ferments lactiques détruits par la pasteurisation.

Le yaourt doit contenir obligatoirement deux ferments caractéristiques *lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, ces bactéries doivent être vivantes et présentes en abondances (**Luquet et Carrieu, 2005**)

La FIL (fédération Internationale Laitière), fixe la quantité de ferments vivants dans le yaourt, 10^7 bactéries par gramme rapportés à la partie lactée jusqu'à la date limite de consommation.

Au lieu d'utiliser la présure, la coagulation du lait est faite par l'addition du jus de citron et de vinaigre blanc, l'acidité de ces deux composants provoque une réaction chimique qui fait que la caséine coagule, s'agglutine et se sépare du lactosérum, et formation d'un caillé.

La présure est un mélange d'enzymes protéolytiques, principalement la chrymosine et une quantité variable de pepsine (**Pien, 1975**). La présence de la présure dans le lait provoque sa coagulation par hydrolyse de la K caséine pour former un caillé dit "caillé présure" (voie enzymatique). (**Lenoir, 1985**).

L'ajout de la présure ou les ferments lactiques permet la coagulation du lait, dans la majorité des cas, les deux techniques sont utilisées simultanément, l'art revient à l'équilibre entre les deux.

IV.4. Examen organoleptique

L'appréciation des qualités organoleptique, reste une opération subjective ; elle comporte les caractères résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 11 : La qualité organoleptique du fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep :

Les caractères	Le fromage frais
Couleur	Blanc
Texture	Homogène, humide
Aromes	Crème fraîche, citron, grains de pin d'Alep
Saveur (acidité et sels)	Moyenne
Gout	Agréable

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude scientifique, nous intéressons à réussir la fabrication d'une nouvelle formulation de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep *P.halepensis Mill*, ainsi le suivi de l'activité antibactérienne de ces grains introduite dans le fromage.

Les analyses physicochimiques du lait cru (l'acidité, lacto-fermentation) sont inacceptables, de plus une présence de certains germes testés (*Salmonelle*, coliformes fécaux, FMAT) qui dépasse les normes, montrent que la qualité microbiologique du lait cru analysé est mauvaise pour les consommateurs, ce qui nous a induit à procéder la pasteurisation. Cette dernière avait pour but d'éliminer ces micro-organismes pathogènes.

Les principaux constituants utilisés pour la fabrication de fromage sont : lait pasteurisé, crème fraîche, citron, vinaigre blanc, poudre des grains de pin d'Alep et le yaourt nature, ces derniers ont plusieurs effets tels la coagulation du lait, le gout agréable ... etc.

Concernant l'activité antibactérienne, nous avons conclu que cette nouvelle formulation de fromage frais enrichi avec les grains de pin d'Alep, n'a subi aucune contamination par *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* pendant toute la période de conservation (21 jours), ce qui signifie la présence d'un effet inhibiteur vis-à-vis ces souches, qui est dû à la présence de poudre des grains de pin d'Alep, ainsi nous pouvons considérer ces grains comme bio-conservateur.

D'après les résultats obtenus, nous se permettons à proposer l'ensemble de ces perspectives :

- L'utilisation des grains de pin d'Alep dans le Domain agroalimentaire.
- Effectuer plus d'études sur la composition biochimiques de ces grains.
- Faire des recherches sur les constituants principaux responsables des effets antimicrobiens, anticancéreux, thérapeutiques... etc.
- Élargir le spectre des espèces bactériennes testées.
- Des études sur la durée de conservation des aliments à base des grains de pin d'Alep.
- Soigner les infections des voies respiratoires (bronchite, toux, rhumes...).

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ✚ **Adda J., Gripon J. C. et Vassel L. (1982).**The chemistry of flavor and texture generation in cheese. Food chemistry .pp: 9,115 - 129.
- ✚ **AFNOR (Association française de normalisation 1993)** Contrôle de la qualité des produits alimentaires : lait et produits laitiers: analyses physicochimiques. Paris La Défense : AFNOR, 4e éd., 581 p.
- ✚ **Agabriel C., Coulon J.B., Brunschwig G., Sibra C. et Nafidi C. (1995).** Relations entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations. INRA Prod. Anim., 8 (4). pp : 251-258.
- ✚ **ALAIS. C., COLL., 2003:**Laits et produits laitiers .In biochimie alimentaire 5éme Ed: Dunod, paris ; p250.ISBN:2-10.003827-3.
- ✚ **Ameur.H., 2007:** Contribution à l'étude des principes du système HCCP la laiterie "Tchin-lait Condia".Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur en contrôle de qualité p : 17.
- ✚ **ASHNAFI M., 1996.** Effect of container smoking and incubation temperature on the microbiological and ergo of traditional Ethiopian sour milk. International Dairy J., 6 pp. 94- Arimi S.M, Omare A.O, Dermot J.J, 2000, 5-104.
- ✚ **A.Foschini (1949), SUR LA DÉTERMINATION DE L'ACIDITÉ TITRABLE DU LAIT.** Le Lait, INRA Editions, 29 (285_286), pp.225-231. fihal-00927987f

B

- ✚ **BENAISSA O., 2011.** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique. Thèse Doctorat. 03 p.

- ✚ **Bengoumi M., Faye B. et Tressol J.C., 1994.** Composition minérale du lait de chamelle du Sud Marocain. Actes de l'atelier Chameaux et dromadaires, Animaux laitiers. Ed. CIRAD (Coll.Colloques), p. 145-149. Black H.E., Rosenblum I.Y. and Capen C.C., 1980. Chemically Induced (Streptozotocin-Alloxan) Diabetes Mellitus in the Dog. Biochemical and Ultra-structural Studies. American Journal of Pathology, 98 (2), p. 295-309. Elkhidir H.E., 2002. Vitamin C status in Sudanese camels. PhD Thesis, University of Utrecht, Pays-Bas, 98 p. Farah Z., Rettenmaier R. and Atkins D., 1992. Vitamin content of camel milk. Int. J. for Vitamins Nutrition Res., 62, 1, p. 30-33.
- ✚ **Beker M, Picard J.F et Timbal J, 1982.** Larousse des arbres et arbustes de l'Europe occidentale Librairie Larousse, Paris, 330 p
- ✚ **Boudy P, 1955.** Economie forestière nord-africaine. Tome 4 : Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. Larose, Paris, 483 p.

C

- ✚ **Cayot P, Lorient D, 1998.** Structures et tecnofonctions des protéines du lait. Tec et Doc. Lavoisier, Paris
- ✚ **Cécile L, 2011.** Microflore du lait: Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et leurs facteurs de variation. Ed : CNAOL, RMT Fromages de terroir ; Institut d'élevage. France.
- ✚ **CHOKRI M., 2005.** Etude de l'effet de l'irradiation sur la conservation de pin d'Alep et sur les mycotoxines. Thèse Doctorat. Pp 13-17.
- ✚ **Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology. 88, pp.170-175.
- ✚ **CODEX ALIMENTARIUS. (1999).** Norme générale pour l'utilisation de termes de laiterie CODEX STAN 206-1999. pp: 1-4

D

- ✚ **Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahmed MB, Ezzat MO, Majid AS, et al. (2015).** The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* ; 20, pp.11808-11829.
- ✚ **DOSSOU J, HOUNZANBGE, ADOTE S. SOULE H., 2006.** Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Bénin. Guide de bonnes pratiques, 33p.
- ✚ **Dimaki, A. ; Kyriazi, M. ; Leonis, G. ; Sfiniadakis, I. ; Papaioannou, G.T. ; Ioannou, E. ; Roussis, V. ; Rallis, M. (2019).** Diabetic skin and UV light: Protection by antioxidants. *Eur. J. Pharm. Sci.* 127, pp.1–8

E

- ✚ **Eck A et Gillis JC. 2006.** Le fromage. 3ème Edition, Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 891p.
- ✚ **ECK A. (1990) :** Le fromage, Lavoisier, 2ème édition, Paris. P. 539.
- ✚ **ECK A. (1990).** Le Fromage 3ème édition, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.
- ✚ **EVETTE J.L., 1975.** La fromagerie.- Paris : Presses universitaires de France, 140 p.

F

- ✚ **Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., & Costa, J. (2014).** Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian pacific journal of tropical disease*, 4(2), pp. 97-103.

- ✚ **FIL ; Fédération internationale de laiterie. (1984).** Séminaire sur les laits fermentés, Avignon 14-16 mai. Bulletin International Dairy Federation. 179.
- ✚ **FOOK Y., AMMINAH A., MOHD KHAN A., 2004.** Microbiological quality and safety of raw milk in Malaysia, Food microbiology, V21, issue 5, 535-541.

G

- ✚ **Guiraud JP., 1998.-** Microbiologie alimentaire: Edition Dunod. *Paris*. France.
- ✚ **GUINOT T. P., AMMOURY M., LAURENT F., 1995.** Effects of storage conditions on the composition of raw milk. *Int. Dairy J.*, 5, 211-223.

H

- ✚ **Hamama A, El Hankouri N, El Ayadi M,(2002),** Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202 Rabat-Instituts, Rabat.
- ✚ **HAMAMA A., EL MOUKTAFI M., 1990.** Étude de la qualité hygiénique du lait cru produit au Maroc. - *Maghreb Vét.*, n°5, 17-20 p

J

- ✚ **JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P. et BRULE G., (2008)** Les produits laitiers ,2ème édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages)
- ✚ **JORA n° 39,** (Journal Officiel du la République Algérienne, 2016) Arrêté interministériel du 4 Octobre 2016, Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, 13, pp 32.
- ✚ **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 70**

K

- ✚ **Kadari A., 2012** : Etude exploratoire des acides gras polyinsaturés des aiguilles de pin, université aboubekr.
- ✚ **Kaplan M, Mutlu EA, Benson M, Fields JZ, Banan A, Keshavarzian A. (2007).** Use of herbal preparations in the treatment of oxidant mediated inflammatory disorders. Ther Med; 15, pp.207-216.
- ✚ **Kadik B, 1987.** Contribution à l'étude du pin d'Alep (*pinus halpensis Mill*) en Algérie. Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. O.P.U ; 580 p.
- ✚ **KORA S., 2005.** Contribution à l'amélioration de la technologie de production du fromage peulh au Bénin. Thèse d'ingénieur Agronome. Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

L

- ✚ **LABIOUI H., ELMOUALDI L., BENZAKOUR A., EL YACHIOUI M., BERNY E. H., OUHSSINE M., 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 148, 7-16pp.
- ✚ **Lankveld JMG, 1995** : Protein standarized milk produits, composition and properties -IDF Brussels 70-85.
- ✚ **Lenoir J, 1985** : Les caséines du lait. RLF, 440 : 17-23.
- ✚ **Lenoir J, Lambert G, Schmidt JL (1983)** L'élaboration d'un fromage : "exemple du camembert. Pour Sei 69, 30-42
- ✚ **Luquet F.M. & Carrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Techniques et documentation. Lavoisier (Ed.), Paris. 307.

- ✚ **Luquet F.M., (1990):**Laits et produits laitiers Vache, Brebis, Chèvre.2eme Edition : Tec et Doc. Lavoisier France.

M

- ✚ **Mhone T.A., Matop G, & Saidi P.T. (2011).** – Aerobic bacterial, coliform, *Esherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *Int. J. Food microbiol.*, 151, 223-228 pages.

N

- ✚ **Nahal I, 1962.** Le pin d'Alep. Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole.

O

- ✚ **Ouali S., 2003** - Qualité du fromage à pâte molle type Camembert fabriqué à la Laiterie de Draa Ben Khedda : nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l'affinage et de l'entreposage réfrigère du fromage. Mémoire De Magister en Sciences Alimentaires. Université Frères Mentouri. Constantine.
- ✚ **OUBARI R., 2004.**"Analyse physicochimique et microbiologique du lait et effet de propolis sur la qualité microflore d'intérêt hygiénique du lait, Mémoire, Faculté des Sciences de Kenitra, Maroc.

- ✚ **Ould Ali -O, 1995.** Evaluation de la qualité physicochimique et microbiologique du lait pasteurisé partiellement écrémé fabriqué par l'OROLAIT - Unité « El Emir ». TIZI-MASCARA. Institut des sciences agronomiques - Département Technologie agro-alimentaire. Centre Universitaire de MASCARA.
- ✚ **Orazio, J.; Jarrett, S.; Amaro-Ortiz, A.; Scott, T. (2013).** UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci*, 14, pp. 12222–12248.

P

- ✚ **Parde,J .(1957)** ,La productivité de pin d'Alep en France .Ecole Nat .Equx Forets, Nancy .p365.
- ✚ **Petri, A.;Alexandratou, E.; Kyriazi, M.; Rallis, M.; Roussis, V.; Yova, D. (2012),** Combination of Fospeg-IPDT and a natural antioxidant compound prevents photosensitivity in a murine prostate cancer tumor model. *Photodiagnosis Photodyn*. 9, pp.100–108.
- ✚ **Pien J, 1975** : Physicochimie du lait. Tech lait, 841 : 13-149 844 : 21-23

Q

- ✚ **Quezel P, 1986 a.** Les pins du groupe —Halepensis Ecologie,Végétation, Ecol physiologie.CIHEAM- Options Méditerranéennes. pp. 11-23.
- ✚ **Quezel P, 1986 b.** Biogéographie et écologie des conifères sur le pourtour méditerranéen. Dans: Actualités d'Ecologie Forestière (Ed. : Pesson), Ed. Gauthier Villars, Paris, pp. 205-256.

R

- ✚ **Ramet J.P. (1985).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection FAO Alimentation et nutrition n°48.

- ✚ **Remeuf F., Cossi N., Dervi N. et Tomasson R. (1991).** Relation entre les paramètres physico-chimiques du lait et son aptitude fromagère. Tec et Doc Lavoisier, Paris. 549p
- ✚ **Robinson R.K. (2002).** Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk products. Third edition. Edition John Wiley and sons, INC. New York.780p.

S

- ✚ **Seigue A., 1985.**La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 502 p.

T

- ✚ **TAYBI N.O., ARFAOUI A., FADHI M., 2014.** Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. International Journal of Innovation and Scientific Research ISSN 2351-8014 Vol. 9 No. 2 Sep. 2014, pp. 487-493 © 2014 Innovative Space of Scientific Research Journals <http://www.ijisr.issr-journals.org/>
- ✚ **Tukan. S.K, K. Al-Ismail R.Y. Ajo, M.M. Al-Dabbas1, (2013),** Seeds and seed oil compositions of Aleppo Pine (*Pinus halepensis Mill*) grown in Jordan. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 90 (2), pp.87-93.Seladji, 2014.

V

- ✚ **Vignola C. (2002).** Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75.

W

✚ **Walstra, P., Wouters, J.T.M, Geurts T.J., (2006)** Dairy Science and technology, Principles of Milk Properties and Processes.

✚ **WANG L, WELLERC.L. 2006.** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology. 17, Pp300-312. Weber, F, 1997 : l'égouttage du coagulum dans le fromage (Coord ACKA), 2ème édition, p. 122

Z

✚ **Zenzen W, 2016.** Utilisation du S.I.G pour l'analyse de la structure de la forêt de Ouennougha dans la Wilaya de Bordj Bou Arreridj, mémoire, master en foresterie, univ. Tlemcen 60p.

✚ **Zoumpliou, V. ; Stamatiadi, M. ; Vassiliadis, C. ; Rallis, M. ; Papaioannou, G.T. ; Liakos, S. ; Angelou, A. ; Daskalaki, S. ; Kyriazi, M. ; Roussis, V. ; et al. (2014),** Effect of Cigarette Smoke on Diabetic Skin and Protection with Topical Administration of *Pinus halepensis* Extract. *Am. J. Plant Sci*, 5, pp.3964-3974.

Annexes

Annexes

ANNEXES

ANNEXE 01 : Composition des milieux de cultures

Composition du milieu VRBG

Composant	g/l
Peptone	7
Extrait de levure	3
Glucose	10
Chlorure de sodium	5
Sels biliaires n°3	1,5
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002

Composant du milieu Hektoen

Composants	g/l
Mélange de peptone	25
Lactose/ Saccharose	12
Salicine	1
Chlorure de sodium	2
Thiosulfate de sodium	1
Citrate d'ammonium	2
Citrate trisodique	1,25
Sels biliaires	1,5
Acide fuschique	0,025
Bleu de bromothymol	0,05

Composant du milieu gélose nutritive

Composants	g/l
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	5
Peptone	5

Annexes

Composant d'eau physiologique

Composants	Unité
Chlorure de sodium	9g
Eau distillé	100ml

Composition du milieu chapman

Composition	g/l
Peptone	10 g
Extrait de bœuf	1 g
Chlorure de sodium	75 g
D-mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,25 g
Agar	15 g.

Composition de milieu braid parker

Composition	Unité
Peptone de caséine	10 g
Extrait de bœuf	5 g
Extrait de levure	1 g
Glycine	12 g
Pyruvate de sodium	10 g
Chlorure de lithium	5 g
Émulsion de jaune d'œuf	50 mL (jaune d'œuf dilué à 30% dans du sérum physiologique)
Tellurite de potassium	1g
Agar	20 g.

Annexes

Composition de bouillon sélénite

Composition	g/l
Tryptone	5 g
Lactose	4 g
Sélénite	4 g
Hydrogénosélénite de sodium	4 g
Eau distillée	1 L

Composition de milieu SS

Composition gélose SS	unité
Peptone	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Sels biliaires	8,5 g
Vert brillant	0,33 mg
Lactose	10,0 g
Rouge neutre	25 mg
Thiosulfate de sodium	8,5 g
Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g
Citrate de sodium	8,5 g
Agar	15,0 g
pH = 7,3	= 7,3
Eau distillée	qsp 1 L

Résumé :

Le premier point traité dans ce travail est la fabrication d'une nouvelle formulation de fromage frais enrichi avec les grains d'une plante médicinale *pinus halepensis Mill*, dont le processus de fabrication a été commencé par la pasteurisation du lait cru, puisque ce dernier a montré des résultats inacceptables sur le plan microbiologique, et cela d'après les analyses physicochimiques et microbiologiques effectués qui comprennent : l'acidité titrable, lactofermentation, test à ébullition et la matière sèche, ainsi le dénombrement de : La flore mésophile aérobie totale, *Staphylococcus aureus*, les coliformes fécaux et *Salmonella*.

Le deuxième volet de cette étude concerne le suivi de la qualité microbiologique de fromage frais, après son enrichissement par les grains de pin d'Alep, les résultats obtenus ne montrent aucune croissance bactérienne pendant la période de conservation vis-à-vis les germes testés : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

Mots clés : Lait cru, Fromage frais, *Pinus halepensis Mill*, Grains de pin d'Alep, Qualité microbiologique, Enrichissement.

Abstract :

The first point dealt with in this work is the manufacture of a new formulation of fresh cheese enriched with the seeds of a medicinal plant *Pinus halepensis Mill*, whose manufacturing process was started by the pasteurization of raw milk, since the latter showed unacceptable results microbiologically, and this according to the physicochemical and microbiological analyses carried out which include: titratable acidity, lacto-fermentation, boiling test and dry matter, as well as the enumeration of : Total aerobic mesophilic flora, *Staphylococcus aureus*, fecal coliform and *Salmonella*.

The second part of this study concerns the monitoring of the microbiological quality of fresh cheese, after its enrichment by Aleppo pine seeds, the results obtained show no bacterial growth during the period of conservation vis-à-vis the germs tested: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

Key words: Raw milk, Fresh cheese, *Pinus halepensis Mill*, Aleppo pine seeds, Microbiological quality, Enrichment.

المخلص :

النقطة الأولى التي تم تناولها في هذا العمل هي تصنيع تركيبة جديدة من الجبن الطازج المخصب بحبوب نبات طبي *Pinus halepensis Mill*، الذي بدأت عملية التصنيع ببسترة الحليب الخام، حيث أظهر الأخير نتائج غير مقبولة ميكروبيولوجيًا، وذلك وفقًا للتحليلات الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية التي تم إجراؤها والتي تشمل: الحموضة القابلة للمعايرة، والتخمير اللاكتيكي، واختبار الغليان، والمادة الجافة، وكذلك تعداد العضويات الدقيقة الهوائية أليفة الاعتدال، و *Staphylococcus aureus*، و البكتيريا القولونية البرازية، *Salmonella*.

الجزء الثاني من هذه الدراسة يتعلق بمراقبة الجودة الميكروبيولوجية للجبن الطازج، بعد تخصيبها ببذور الصنوبر الحليبي، والنتائج التي تم الحصول عليها لا تظهر أي نمو جرثومي خلال فترة التخزين مقابل الجراثيم المختبرة : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

الكلمات المفتاحية : الحليب الخام، جبن طازج، *Pinus halepensis Mill*، بذور الصنوبر الحليبي، الجودة الميكروبيولوجية، تخصيب.